

**UNIVERSITÉ MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER II

Discipline : Biotechnologie, Microbiologie

École Doctorale : Sciences des Procédés – Sciences des Aliments

présentée et soutenue publiquement

par

LE NGUYEN Doan Duy

Le 04 Décembre 2008

Détermination de l'origine géographique des poissons par l'obtention de l'empreinte génétique de leur communauté bactérienne par PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

JURY

Mme Sabine GALINDO

M Didier MONTET

M Gérard LOISEAU

M Henry-Eric SPINLER

Mme Véronique VERREZ-BAGNIS

M Jean-Luc THOLOZAN

Université Montpellier II

CIRAD Montpellier

SupAgro Montpellier

AgroParisTech

IFREMER Nantes

Université de Provence

Marseille

Président

Directeur de Thèse

Co-directeur de Thèse

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Remerciements

Cette étude a abouti à ce jour grâce au financement apporté par le Gouvernement vietnamien.

Je voudrais remercier l'École Doctorale Sciences des Procédés-Sciences des Aliments de l'Université Montpellier II pour mon inscription en thèse. Je voudrais remercier également le CIRAD de Montpellier et la Faculté d'Agriculture de l'Université de Cantho, Vietnam pour m'avoir permis de réaliser mon travail de thèse au sein de ses laboratoires.

Avant tout, je voudrais exprimer ma reconnaissance au Dr. Didier MONTET pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être mon Directeur de Thèse. Malgré un emploi du temps très chargé, sa présence, sa disponibilité, son soutien et son attitude positive et amicale ont été des éléments très importants de ma motivation. La qualité de mon travail a été considérablement améliorée grâce à vos commentaires.

Je souhaite aussi remercier le Dr. Gérard LOISEAU, toujours de bonne humeur, toujours avec beaucoup d'idées et toujours avec ses blagues. Vos remarques pertinentes n'ont fait qu'améliorer le développement de mon travail. Vous resterez à mes yeux comme des personnes entières et pleines de talents aussi bien dans la recherche que dans les relations humaines. Des fois, les mots ne suffisent pas pour exprimer tout le bien qu'on ressent.

Juste MERCI à vous !

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Mme Sabine GALINDO, Professeur à l'Université de Montpellier, à M. Henry-Eric SPINLER, Professeur à AgroParisTech, à Mme Véronique VERREZ-BAGNIS, chercheur à l'Ifremer de Nantes et à M. Jean-Luc THOLOZAN, professeur de l'Université de Provence et

de la Méditerranée de Marseille pour avoir accepté de consacrer votre temps pour juger mon travail.

Je voudrais remercier M. Thierry GOLI pour son soutien tout au long de ma thèse.

Je voudrais remercier Mme Marie-Pierre OBEDE pour sa bonne humeur, la relecture et la mise en forme de ce mémoire de thèse.

Je voudrais remercier Mme Chantal CANALES pour son aide et sa disponibilité.

Ma reconnaissance va également aux techniciens Isabelle METAYER et Daniel DIJOUX pour leur coup de main.

Je tiens à remercier l'ensemble des ex-thésards, thésards et stagiaires du CIRAD, entre autre Ratanaporn, Gaukhar, David, Zelalem, Nicolas, Carolina, Nelly, Elodie, Komkhae, Alexandre, Aly, By, Ana, Shynar,... pour l'ambiance qui a contribué à des moments d'échanges culturels et personnels très forts.

Je voudrais remercier toute ma famille, tous mes amis, collègues, au Vietnam et en France pour leur soutien moral au cours de ces trois années, entre autre Ba, Me, Khoi, My, Ha, Zijun, Manh, Phuong, Thao, Dung, Minh, Huong, Vu, Truc, Hung An, Giang, Cang, Chau, Thong, Thang, Chun.

Je remercie aussi Mme HA Ngoc Hanh pour son soutien moral.

Je tiens à remercier à tous les personnels de l'Ifremer Palavas, de la société Aquanord, de la société Viviers du Gois, de la société « Les bars du soleil » et de la ferme aquacole du CIRAD pour votre support des échantillons de bars et de tilapias.

Je remercie tous les éleveurs de poissons-chats Pangasius au Vietnam et M. Vien, directeur de l'usine de transformation de filet de poisson-chats qui m'ont accueilli et rendu service en me permettant de réaliser cette recherche.

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomique
ADNr 16S	ADN codant pour la sous unité 16S de l'ARN ribosomal
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
APS	Persulfate d'ammonium
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	ARN ribosomale
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
BET	Bromure d'éthidium
BSA	Bovine Serum Albumin
CE	Communauté Européenne
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DMSO	Di methyl sulfoxyde
dNTP	Deoxynucléotide triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
CE	Communauté Européenne
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FICen	Fisheries Information Center, Ministry of fisheries, Vietnam
kb	Kilo paires de bases
MATAB	Mixed Alkyl Trimethyl Ammonium Bromide
p/v	Masse à volume
pb	Paires de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGFE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Length Fragment Polymorphism
SOFIA	La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture
S	Svedberg
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SSCP	Single-Stranded Conformation Polymorphism
T-RFLP	Terminal Restriction Length Fragment Polymorphism

TAE	Tris/ Ammonium/ EDTA (tampon)
TE	Tris/ EDTA (tampon)
TEMED	N, N, N', N' Tétraméthyléthylènediamine
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis
Tm	Température de fusion
UE	Union Européenne
UFC	Unité Formant Colonie
UPGMA	Unweighted Pair-wise Grouping with Mathematical Averages
v/v	Volume à volume

Liste des illustrations

Chapitre I

Figure I.1. : 2 espèces principales de poissons-chats du delta du Mékong.....	10
Figure I.2. : Élevage en cages flottantes	12
Figure I.3. : Exportation du <i>Pangasius</i> du Vietnam (en quantité et en valeur)	15
Figure I.4. : 2 espèces principales de Tilapia.....	18
Figure I.5. : Bar (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	20
Figure I.6. : Représentation schématisée de la méthode PCR-DGGE	60
Figure I.7. : Diagramme des différentes étapes de l'analyse PCR-DGGE. Application à l'analyse d'échantillons environnementaux ou d'échantillons alimentaires	61
Figure I.8. : Principe de la rep-PCR	70

Chapitre II

Figure II.1 : Région d'échantillonnage en France	72
Figure II.2. : Région d'échantillonnage au Vietnam	74
Figure II.3. : Photo de la ferme aquacole du district de Chau Phu, région d'An Giang dans le delta du Mékong au Vietnam.....	74
Figure II.4. : Région d'échantillonnage au Cambodge	75
Figure II.5. : Ligne de transformation du filet de <i>Pangasius</i> dans l'usine vietnamienne	78
Figure II.6. : Plan d'échantillonnage des filets de poisson	78
Figure II.7. : Préparation du gel de DGGE.....	84
Figure II.8. : Exploitation d'un gel DGGE.....	86
Figure II.9. : Plan expérimental pour étudier la variabilité de la position des bandes et de la répétabilité des gels de DGGE.....	88
Figure II.10. : Plan expérimental pour mesurer l'évolution bactérienne avant et après le filetage	90
Figure II.11. : Plan expérimental présentant les effets des traitements de marinage, de séchage et de réfrigération sur les marqueurs bactériens	91
Figure II.12. : Plan expérimental pour mesurer l'effet des répétitions des cycles de congélation-décongélation sur les profils microbiens des poissons.....	92
Figure II.13. : Plan expérimental pour mesurer l'effet de la congélation sur les profils microbiens des poissons	93

Chapitre III

Figure III.1. : Photo de 3 gels indépendants de DGGE d'ADN bactériens extraits d'un bar élevé à IFRMER Palavas	103
Figure III.2. : Photo de gel d'agarose à 0,8% de vérification de l'efficacité de l'extraction des ADN bactériens des poissons.....	105
Figure III.3. : Photo de gel d'agarose à 2% de vérification de l'amplification des ADN bactériens extraits des poissons	106
Figure III.4. : Photo du gel de DGGE d'ADN bactérien extraits de bars de différentes origines géographiques.....	108
Figure III.5. : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN bactérien extraits de bars de différentes origines géographiques.....	109

Figure III.6. : Photo du gel DGGE d'ADN bactérien extrait de <i>Pangasius</i> du Vietnam et du Cambodge.....	110
Figure III.7. : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN bactériens extraits <i>Pangasius</i> du Vietnam et du Cambodge	110
Figure III.8. : Emballage vietnamien d'aliments pour poisson.....	111
Figure III.9. : Photo des gels de DGGE d'ADN bactérien extrait de <i>Pangasius</i> capturés dans 5 districts différents de la région d'An Giang	112
Figure III.10. : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN bactérien extraits de <i>Pangasius</i> capturés dans 5 districts différents de la région d'An Giang	113
Figure III.11. : Séquençage des bandes DGGE d'ADN bactérien extrait des poissons-chats <i>Pangasius</i> issues de 5 districts différents de la région d'An giang.....	115
Figure III.12. : Dendrogramme de proximité des séquences et identité des souches bactériennes	116
Figure III.13. : Photo des gels de DGGE de l'eau et des <i>Pangasius</i> d'un même étang de 4 districts de la région d'An Giang.	127
Figure III.14. : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN bactériens de l'eau et des <i>Pangasius</i> d'un même étang de quatre districts de la région d'An Giang	128
Figure III.15. : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN bactérien extrait de poissons différents et d'origines différentes.....	130
Figure III.16. : Photos des gels de DGGE d'ADN bactérien extrait des <i>Pangasius</i> issus de districts différents de la région d'An Giang.....	132
Figure III.17. : Photos des gels de DGGE d'ADN bactérien extrait des <i>Pangasius</i> issus de districts différents de la région d'An Giang.....	133
Figure III.18. : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN bactérien de <i>Pangasius</i> issus de 4 districts de la région d'An Giang	133
Figure III.19. : Analyse factorielle des profils DGGE des <i>Pangasius</i> capturés dans 4 districts différents de la région d'An Giang.....	134
Figure III.20. : Photo de gel DGGE d'ADN bactérien extrait de bars capturés dans un aquarium alimenté par de l'eau de mer recyclée (ASC) et dans un aquarium alimenté par de l'eau de mer courante (C1) à la station IFREMER de Palavas.....	136
Figure III.21. : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN bactérien extrait de bars capturés dans un aquarium alimenté par de l'eau de mer recyclée (ASC) et d'un aquarium alimenté par de l'eau de mer courante (C1) à la station IFREMER de Palavas.....	137
Figure III.22. : Photo de gel DGGE d'ADN bactérien extrait de filets de tilapias ayant subi le filetage, le marinage, le séchage et la réfrigération à 4°C	139
Figure III.23. : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN bactérien extrait de filets de tilapias ayant subi le filetage.	140
Figure III.24. : Évolution de la température à cœur des filets de tilapias lors de la répétition des cycles de congélation-décongélation.....	143
Figure III.25. : Photo de gel DGGE d'ADN bactérien extrait de filets de tilapias ayant subi la répétition des cycles de congélation-décongélation et la congélation en chambre froide (-20°C)	145
Figure III.26. : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN bactérien extrait de filets de tilapias ayant subi la répétition des cycles de congélation-décongélation et la congélation en chambre froide (-20°C).....	146
Figure III.27. : Photo de gel DGGE d'ADN bactérien extrait de <i>Pangasius</i> lors de transformation en filet, dans une usine au Vietnam	153

Figure III.28. : Photo de gel DGGE d'ADN bactérien extrait des prélèvements réalisés sur les équipements de transformation	157
Figure III.29. : Dendrogramme de comparaison des séquences de toutes les bandes présentes sur les gels de DGGE réalisés avec les échantillons de filets de <i>Pangasius</i> ou des prélèvements de surface des équipements	160
Figure III.30. : Photos de gels d'agarose des produits de Rep-PCR des souches de <i>Pseudomonas</i> isolées de l'environnement d'élevage et des poissons <i>Pangasius</i>	166
Figure III.31. : Dendrogramme des profils Rep-PCR générés par l'amorce BOX des <i>Pseudomonas</i> isolés de l'environnement d'élevage et des <i>Pangasius</i>	168
Figure III.32. : Dendrogramme de comparaison des séquences du gène de l'ARNr 16s de 16 souches présumées être des <i>Pseudomonas</i> isolés de l'environnement d'élevage et des <i>Pangasius</i>	171

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau I.1. : Production mondiale des pêches et de l'aquaculture (FAO/SOFIA 2006).	4
Tableau I.2. : Production aquacole des 10 principaux producteurs de poisson ; volume et croissance émergente	6
Tableau I.3. : Principaux pays exportateurs et importateurs de produits halieutiques	8
Tableau I.4. : Les <i>Pangasiidae</i> d'intérêt aquacole présents dans le delta du Mékong	11
Tableau I.5. : Exportation du <i>Pangasius</i> du Vietnam (par marché)	15
Tableau I.6. : Importation de Tilapia sur le marché américain	19
Tableau I.7. : Importation de Tilapia sur le marché américain (par pays d'origine)	19
Tableau I.8. : Production mondiale du bar (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	21
Tableau I.9. : Cultivabilité déterminée comme le pourcentage des bactéries cultivables par rapport aux cellules totales déterminées par comptage direct	51

Chapitre II

Tableau II.1 : Liste des fermes aquacoles françaises où ont été prélevés les échantillons de bars	72
Tableau II.2. : Liste des fermes aquacoles du Vietnam où ont été prélevés les échantillons de poissons-chats <i>Pangasius</i>	73
Tableau II.3. : Liste des fermes aquacoles du Cambodge où ont été prélevés les échantillons de poissons-chats <i>Pangasius</i>	75
Tableau II.4. : Liste des fermes du Vietnam où ont été prélevés les échantillons d'eau	76
Tableau II.5. : Aquarium français où ont été prélevés les échantillons de Tilapia	79
Tableau II.6. : Séquence des amorces GC338f et 518r utilisées en PCR	82
Tableau II.7. : Composition du mélange réactionnel de PCR	82
Tableau II.8. : Conditions des réactions de PCR	83
Tableau II.9. : Composition des gels de DGGE pour un gradient dénaturant de 30 à 60%	84
Tableau II.10. : Séquences de l'amorce BOX utilisée	96
Tableau II.11. : Composition du mélange réactionnel de la REP-PCR	97
Tableau II.12. : Composition du tampon de Gitschier 5X	97
Tableau II.13. : Conditions des réactions de la Rep-PCR	97
Tableau II.14. : Séquence des amorces MM3 et P13 utilisées en PCR	99
Tableau II.15. : Composition du mélange réactionnel de PCR	99
Tableau II.16. : Conditions des réactions de PCR	100

Chapitre III

Tableau III.1. : Valeur de la moyenne et de l'intervalle de confiance (IC) des distances relatives de migration de toutes les bandes DGGE	104
Tableau III.2. : Noms des souches bactériennes détectées par PCR-DGGE au cours de la transformation de <i>Pangasius</i> en filet dans une usine au Vietnam	153
Tableau III.3. : Évolution de la présence des bactéries sur les filets de <i>Pangasius</i> au cours de sa transformation	154

Tableau III.4. : Noms des souches bactériennes présentes sur la surface des équipements utilisés pour la production de filets de <i>Pangasius</i> au Vietnam	158
Tableau III.5. : Évolution de la présence des bactéries à la surface des équipements de transformation au cours du filetage et après le nettoyage et la désinfection.....	159
Tableau III.6. : Identité des 16 souches présumées être des <i>Pseudomonas</i> isolées de fermes, de poisson entier ou de filet de <i>Pangasius</i> au Vietnam	169

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	4
I.1. SITUATION MONDIALE DU SECTEUR DES PÊCHES ET DE L'AQUACULTURE.....	4
I.1.1 PRODUCTION DES PÊCHES DE CAPTURE	4
I.1.2. PRODUCTION DE L'AQUACULTURE	5
I.1.3. UTILISATION DU POISSON	6
I.1.4. LE COMMERCE INTERNATIONAL DU POISSON.....	7
I.2. LE POISSON CHAT <i>PANGASIUS</i>	9
I.2.1. GÉNÉRALITÉS.....	9
I.2.2. LA PANGASICULTURE DANS LE DELTA DU MÉKONG AU VIETNAM.....	11
I.2.3. LA GUERRE DU CATFISH	16
I.3. LE TILAPIA	17
I.3.1. GÉNÉRALITÉS.....	17
I.3.2. LE MARCHÉ DES TILAPIAS	18
I.4. LE BAR.....	19
I.4.1. GÉNÉRALITÉS.....	19
I.4.2. LE MARCHÉ DU BAR	20
I.5. DIVERSITÉ DE LA FLORE MICROBIENNE DU POISSON.....	21
I.5.1. LES BACTÉRIES DES ŒUFS DU POISSON	21
I.5.2. LES BACTÉRIES DE LA LARVE DU POISSON	21
I.5.3. LES BACTÉRIES DU POISSON MATURE	22
I.6. FACTEURS INFLUENÇANT LA DIVERSITÉ DE LA MICROFLORE BACTÉRIENNE DU POISSON	23
I.6.1. INFLUENCE DE LA QUALITÉ DE L'EAU	23
I.6.2. INFLUENCE DE LA SALINITÉ DE L'EAU	24
I.6.3. INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE DE L'EAU ET DES SAISONS	24
I.6.4. INFLUENCE DU RÉGIME ALIMENTAIRE	25
I.6.5. INFLUENCE DE L'UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES	25
I.6.6. INFLUENCE DES FACTEURS DANS LES PROCÉDÉS DE TRANSFORMATION	26
I.6.6.1. <i>Effet du froid</i>	26
I.6.6.2. <i>Effet du traitement thermique</i>	28
I.6.6.3. <i>Effet du séchage et du salage</i>	28
I.6.6.4. <i>Effet du fumage</i>	29
I.6.6.5. <i>Effet du marinage (acidification)</i>	30
I.6.6.6. <i>Effet synergique par association de différents procédés.</i>	30
I.7. LA TRAÇABILITÉ.....	31
I.7.1. DÉFINITION	31
I.7.2. IMPORTANCE DE LA TRAÇABILITÉ EN AGRO-ALIMENTAIRE.....	32
I.7.3. LÉGISLATION EUROPÉENNE POUR LA TRAÇABILITÉ	35

I.7.4. LA TRAÇABILITÉ DU POISSON ET DES PRODUITS HALIEUTIQUES.....	36
I.8. DÉTERMINATION DE L'ORIGINE GÉOGRAPHIQUE	39
I.8.1. OBJECTIF.....	39
I.8.2. MÉTHODES ANALYTIQUES PERMETTANT LA DÉTERMINATION DE L'ORIGINE GÉOGRAPHIQUE	40
I.8.2.1. <i>Eléments minéraux et oligoéléments</i>	40
I.8.2.2. <i>Les isotopes stables</i>	42
I.8.2.3. <i>Composition chimique globale ou analyse des constituants majeurs</i>	45
I.8.2.4. <i>Composés volatils</i>	46
I.8.2.5. <i>Détermination génétique des animaux</i>	46
I.8.2.6. <i>Profil microbiologique</i>	49
I.8.2.7. <i>Analyse de la résistance aux antibiotiques</i>	50
I.9. MÉTHODES D'ANALYSE DE LA BIODIVERSITÉ MICROBIENNE.....	50
I.9.1. MÉTHODES TRADITIONNELLES	50
I.9.2. MÉTHODE DE CULTURE-INDÉPENDANTE.....	52
I.10. LES ACIDES NUCLÉIQUES ET LES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE EN ÉCOLOGIE MICROBIENNE	53
I.10.1. LE DÉVELOPPEMENT DES TECHNIQUES MOLÉCULAIRES.....	53
I.10.2. ETUDE DES ARN RIBOSOMIQUES (ARNr)	53
I.10.3. LE CHOIX DE L'ARNr 16S	54
I.10.4. LES TECHNIQUES MOLÉCULAIRES DITES D'« EMPREINTE GÉNÉTIQUE »	55
I.11. LA MÉTHODE DE PCR-DGGE	58
I.11.1. PRINCIPE	58
I.11.2. LES APPLICATIONS DE LA PCR-DGGE.....	61
I.11.2.1. <i>Étude de la biodiversité de la communauté microbienne dans l'environnement</i>	61
I.11.2.2. <i>Suivi et identification de la communauté microbienne au cours des fermentations</i>	62
I.11.2.3. <i>Contrôle de qualité des produits alimentaires</i>	64
I.11.2.4. <i>Authentification et identification d'origine géographique</i>	65
I.11.3. LES LIMITES DE LA PCR-DGGE.....	66
I.11.3.1. <i>Echantillonnage et conservation des échantillons</i>	66
I.11.3.2. <i>Extraction des acides nucléiques</i>	66
I.11.3.3. <i>Amplification par PCR</i>	67
I.11.3.4. <i>La DGGE</i>	68
I.11.3.5. <i>Limite de la détection bactérienne</i>	69
I.12. REP PCR (REPETITIVE ELEMENT SEQUENCE-BASED POLYMERASE CHAIN REACTION).....	69
I.12.1. TECHNIQUE	69
I.12.2. APPLICATIONS DE LA REP-PCR.....	70
II. MATÉRIELS ET MÉTHODES	72
II.1. ÉCHANTILLONNAGE DES POISSONS.....	72
II.1.1. ÉCHANTILLONNAGE DES BARS DE FRANCE	72

II.1.2. ÉCHANTILLONNAGE DES POISSONS-CHATS <i>PANGASIUS</i> AU VIETNAM	73
II.1.3. ÉCHANTILLONNAGE DES POISSONS-CHATS <i>PANGASIUS</i> AU CAMBODGE.....	75
II.1.4. ÉCHANTILLONNAGE DE L'EAU DE L'ÉTANG D'ÉLEVAGE DES POISSONS-CHATS <i>PANGASIUS</i> AU VIETNAM	76
II.1.5. ÉCHANTILLONNAGE POUR L'ÉTUDE DE L'ENVIRONNEMENT DE TRAVAIL DANS UNE USINE DU VIETNAM	76
II.1.6. ÉCHANTILLONS DE <i>TILAPIAS</i>	79
II.2. EXTRACTION DE L'ADN BACTÉRIEN TOTAUX DES POISSONS.....	79
II.2.1. PROTOCOLE D'EXTRACTION.....	79
II.2.2. VÉRIFICATION DE L'EXTRACTION D'ADN SUR GEL D'AGAROSE	81
II.3. AMPLIFICATION DES ADN EXTRAITS PAR RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (PCR)	82
II.3.1. AMORCES UTILISÉES	82
II.3.2. PRÉPARATION DU MÉLANGE RÉACTIONNEL DE PCR	82
II.3.3. CONDITION DE LA PCR ET APPAREILLAGE	83
II.3.4. VÉRIFICATION DES PRODUITS PCR	83
II.4. ÉLECTROPHORÈSE EN GEL D'ACRYLAMIDE AVEC GRADIENT DÉNATURANT (DGGE)	84
II.4.1. COMPOSITION DU GEL DE DGGE	84
II.4.2. PRÉPARATION DU GEL DGGE.....	84
II.4.3. CONDITIONS ÉLECTROPHORÉTIQUES DE LA DGGE	85
II.4.4. TRAITEMENT D'IMAGE ET TRAITEMENT STATISTIQUE DES PROFILS DGGE	85
II.4.5. SÉQUENÇAGE DES FRAGMENTS D'ADN À PARTIR DES BANDES DGGE.....	87
II.5. ÉTUDE DE LA VARIABILITÉ DE LA POSITION DES BANDES ET DE LA RÉPÉTABILITÉ DES GELS DGGE.....	88
II.6. ÉTUDE DE LA PÉRENNITÉ DES PROFILS DGGE BACTÉRIENS.....	89
II.6.1. ANALYSE DE BARS DU MÊME LIEU MAIS ISSUS D'AQUARIUMS DIFFÉRENTS	89
II.6.2. EFFET DES TRAITEMENTS TECHNOLOGIQUES SUR LES PROFILS BACTÉRIENS DU POISSON	89
II.6.2.1. <i>Effet des traitements de filetage, de marinage, de séchage et de réfrigération</i> .	89
II.6.2.2. <i>Effet des répétitions de cycles de congélation-décongélation</i>	91
II.7. ÉTUDES SUR LA DIVERSITÉ DES <i>PSEUDOMONAS</i> AU VIETNAM	93
II.7.1. PRÉLÈVEMENT DES <i>PSEUDOMONAS</i> À PARTIR DE L'ENVIRONNEMENT ET DES <i>PANGASIUS</i>	94
II.7.2. ISOLEMENT ET PURIFICATION DES <i>PSEUDOMONAS</i>	94
II.7.3. REP-PCR (REPETITIVE ELEMENT SEQUENCE-BASED POLYMERASE CHAIN REACTION).....	96
II.7.3.1. <i>Amorce utilisée et conditions de la Rep-PCR</i>	96
II.7.3.2. <i>Électrophorèse en gel d'agarose</i>	98
II.7.3.3. <i>Traitement statistique des profils obtenus sur gel d'agarose</i>	98
II.7.4. IDENTIFICATION DES <i>PSEUDOMONAS</i> PAR BIOLOGIE MOLÉCULAIRE.....	98
II.7.4.1. <i>Extraction d'ADN à partir des souches isolées</i>	99
II.7.4.2. <i>Amplification des ADN extraits par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)</i>	99
II.7.4.3. <i>Purification et séquençage des produits PCR</i>	100

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	101
III.1 ÉTUDE DE LA RÉPÉTABILITÉ DE LA MÉTHODE	101
III. 2. APPLICATION DE LA PCR-DGGE SUR DES POISSONS D'ORIGINES GÉOGRAPHIQUES DIFFÉRENTES	104
III.2.1. ANALYSE DE BARS ÉLEVÉS DANS TROIS RÉGIONS DIFFÉRENTES.....	104
III.2.2 ANALYSE DE PANGASius DU VIETNAM ET DU CAMBODGE.....	109
III.2.3 ANALYSE DES PANGASius DE DIFFÉRENTS DISTRICTS DE LA MÊME RÉGION D'AN GIANG AU VIETNAM.....	111
III.2.4. IDENTIFICATION PAR SÉQUENÇAGE DES BACTÉRIES DOMINANTES SUR LES POISSONS PANGASius DU VIETNAM	114
III.2.5. ÉTUDE DE LA RELATION ENTRE L'EAU DES ÉTANGS D'ÉLEVAGE ET LES <i>PANGASius</i> CAPTURÉS DANS CES ÉTANGS	126
III.2.6 COMPARAISON DE LA TOTALITÉ DES PROFILS DGGE DES POISSONS DE DIFFÉRENTES ORIGINES GÉOGRAPHIQUES	129
III.3. ÉTUDE DE LA PÉRENNITÉ DU MARQUAGE MICROBIEN.....	130
III.3.1. INFLUENCE DE LA SAISON SUR LE MARQUAGE	131
III.3.2. ANALYSE DE BARS DU MÊME LIEU MAIS ISSUS D'AQUARIUMS DIFFÉRENTS.....	135
III.3.3. EFFET DES TRAITEMENTS TECHNOLOGIQUES SUR LE MARQUAGE.....	137
<i>III.3.3.1. Effet des traitements de marinage, de séchage, de réfrigération et de filetage</i>	<i>137</i>
<i>III.3.3.2. Effet des répétitions de cycles de congélation-décongélation.....</i>	<i>142</i>
<i>III.3.3.3. Evolution des profils DGGE microbiens lors de transformation en filet de Pangasius dans une usine au Vietnam.</i>	<i>151</i>
III.3. ETUDES SUR LA DIVERSITÉ DES SOUCHES <i>PSEUDOMONAS</i> AU VIETNAM.....	163
 CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	172
 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	177
 ANNEXES	
ANNEXE 1	228
ANNEXE 2	230
ANNEXE 3	232
ANNEXE 4	233

INTRODUCTION

Dans le cadre de la mondialisation et face aux exigences croissantes du consommateur en termes de qualité et de sûreté des aliments, les règles appliquées par l'Union Européenne pour l'importation des produits alimentaires se durcissent. Cependant, il reste encore difficile de garantir l'origine et le parcours des produits. Seuls les documents administratifs comme le certificat de conformité font état de l'origine et de l'itinéraire des aliments.

Au cours des trois dernières décennies, les échanges commerciaux et la consommation des poissons ont augmenté très rapidement. Suite aux différentes crises alimentaires telle que la crise de vache folle, de la dioxine et la récente crise de la grippe aviaire, les consommateurs sont de plus en plus regardant sur la qualité, l'innocuité et l'origine des produits alimentaires. Les questions touchant au commerce international des produits aquacoles concernent notamment les dispositions en matière d'étiquetage et de traçabilité (FAO/SOFIA 2006).

La contribution de l'aquaculture aux approvisionnements mondiaux de poissons continue de progresser, et poursuit son essor à un rythme plus rapide que celui de tous les autres secteurs de production alimentaire d'origine animale (FAO/SOFIA 2006). L'expansion de la production aquacole a très largement dépassé la croissance démographique. Les pays de la région Asie-Pacifique représentaient 91,5% de la production aquacole mondiale et 80,5% de sa valeur, et le Vietnam fait partie des dix premiers pays exportateurs de poisson. Le Vietnam est le premier exportateur de poisson-chat *Pangasius* avec plus de 300 000 tonnes en 2007 (Vietnam Fisheries Information Center (FICen), 2008). L'exportation des filets de *Pangasius*, après avoir été principalement dirigée vers les États-Unis (fin des années 1990, début des années 2000), s'oriente actuellement vers les pays européens. Cette évolution s'explique par les très nombreuses barrières douanières érigées par les autorités américaines vis-à-vis des poissons chat du Mékong pour protéger leur marché. En 2007, l'Union Européenne était le premier importateur du poisson-chat *Pangasius* du Vietnam avec 140 000 tonnes pour une valeur de 390 millions USD (Vietnam Fisheries Information Center (FICen), 2008). Cependant, sur le marché européen, les produits du poisson-chat *Pangasius* exportés sont encore mal connus par les consommateurs occidentaux et suscitent leur méfiance. De plus, ils sont présents sur le marché international sous des appellations commerciales diverses

(Vietnamese River Cobbler, Mekong catfish, Panga, Panga du Mékong, Ba sa, poisson-chat *Pangasius*,...). La traçabilité de l'origine géographique des produits est donc difficile.

La traçabilité est aujourd'hui devenue la préoccupation constante pour tous les acteurs de la chaîne alimentaire. Les producteurs, transformateurs, distributeurs doivent identifier et maîtriser les points critiques, respecter les réglementations, effectuer des autocontrôles. Les services publics doivent établir et faire respecter les réglementations relatives à la maîtrise de l'hygiène, les consommateurs doivent être informés de la nature des produits et des problèmes sanitaires (Règlement CE 2073/2005 et CE 178/2002).

Compte tenu de la difficulté à mettre en place des systèmes d'identifications enregistrées le plus souvent documentaire dans les pays du Sud et la difficulté de suivre le cheminement des aliments, le CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement) a décidé de financer des travaux de recherche visant à identifier et mettre en œuvre une méthode utilisant la PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) pour analyser la totalité des flores microbiennes présentes sur ou dans les poissons en une seule analyse afin d'établir un code barre biologique permettant de déterminer l'origine géographique des poissons importés. L'hypothèse de départ de ce projet était que l'environnement des poissons pouvait avoir une influence sur sa composition biochimique, chimique ainsi que sur l'identité et la diversité des flores bactériennes présentes sur et dans les poissons. L'origine géographique des poissons pourrait donc être approchée par la caractérisation de la flore microbienne spécifique de la ferme de production ou du lieu de stockage. C'est cette dernière hypothèse qui a été étudiée dans ce projet. Les espèces microbiennes étudiées sont celles appartenant aux flores bactériennes commensales (de la peau, des ouïes ou du système digestif) des poissons, ou des flores microbiennes d'altération : pathogènes des poissons ou contaminants apportés lors des traitements technologiques.

La première phase de ce projet a été consacrée au développement et à la standardisation de la technique de biologie moléculaire. L'originalité de cette méthode est qu'elle est basée sur l'extraction en une seule étape des ADN totaux des bactéries des poissons et de leur caractérisation après amplification et électrophorèse dans un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Un

premier travail a permis de valider l'hypothèse de départ et de standardiser la méthode depuis le prélèvement des échantillons jusqu'à l'obtention et le traitement statistique des profils électrophorétiques obtenus.

Notre travail de thèse s'inscrit dans la deuxième phase de ce projet de collaboration.

Les deux principales questions auxquelles nous voulons répondre sont :

1. Est-ce que les empreintes génétiques des flores bactériennes des poissons données par les profils de DGGE peuvent être utilisées pour effectuer la détermination d'origine géographique des poissons ?
2. Est-ce que les traitements technologiques (chaleur, froid, filetage) appliqués aux poissons en vue de leur commercialisation sont susceptibles de modifier les marqueurs bactériens identifiés au cours des traitements ?

Les objectifs de ce travail sont donc :

1. De valider la mise en œuvre de la méthode optimisée pour relier les profils bactériens de DGGE avec les origines géographiques des poissons provenant de différents sites de plusieurs pays : France, Vietnam, Cambodge.
2. De vérifier la pérennité des profils électrophorétiques au cours des saisons, des conditions d'élevage et de transformations agro-alimentaires.
3. De valider la méthode de PCR-DGGE en milieu industriel pour le suivi de la pérennité des marqueurs bactériens au cours de la transformation de filets dans une usine vietnamienne à chaque étape de leur transformation incluant les traitements de nettoyage et de lavage des équipements. En effet, en 2007, le Vietnam a exporté plus de 300 000 tonnes de *Pangasius*, dont 70% sous forme de filets. Les poissons entiers ne représentent que 20% et le reste étant des produits transformés (FICen, 2008).

I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**I.1. Situation mondiale du secteur des pêches et de l'aquaculture**

Les pêches et l'aquaculture ont produit en 2004 environ 140 millions de tonnes de poissons. L'aquaculture représentait 34% de ce total (Tableau I.1). En 2004, l'offre de poisson de consommation par habitant, hors Chine, était estimée à 13,5 kg. Globalement, le poisson a assuré à plus de 2,6 milliards de personnes au moins 20% de leur apport en protéines animales. La part des protéines de poisson dans le total mondial de l'apport protéique d'origine animale est passée de 14,9% en 1992 au chiffre record de 16% en 1996, pour retomber à environ 15,5% en 2003 (FAO/SOFIA, 2006).

Au cours des trois dernières décennies, le nombre de pêcheurs et d'aquaculteurs a augmenté plus rapidement que la population mondiale et l'emploi dans l'agriculture traditionnelle. Selon les estimations, 41 millions de personnes travaillaient dans ce domaine en 2004, la grande majorité dans les pays en développement, principalement en Asie.

Tableau I.1. : Production mondiale des pêches et de l'aquaculture (FAO/SOFIA 2006).

Production	2000	2001	2002	2003	2004	2005
	<i>(millions de tonnes)</i>					
Pêches continentales						
Pêches de capture	8,8	8,9	8,8	9,0	9,2	9,6
Aquaculture	21,2	22,5	23,9	25,4	27,2	28,9
Total des pêches continentales	30,0	31,4	32,7	34,4	36,4	38,5
Pêches marines						
Pêches de capture	86,8	84,2	84,5	81,5	85,8	84,2
Aquaculture	14,3	15,4	16,5	17,3	18,3	18,9
Total des pêches marines	101,1	99,6	101,0	98,8	104,1	103,1
Total des pêches de capture	95,6	93,1	93,3	90,5	95,0	93,8
Total de l'aquaculture	35,5	37,9	40,4	42,7	45,5	47,8
Total mondial des pêches	131,1	131,0	133,7	133,2	140,5	141,6

I.1.1 Production des pêches de capture

La production des pêches de captures marines s'est chiffrée à 85,8 millions de tonnes en 2004. S'agissant du total des captures mondiales (qui inclut la production des pêches de capture continentales), la tendance récente a été fortement influencée par les fluctuations des prises d'anchois au large des côtes du Pérou et du Chili.

Après un léger fléchissement en 2002, le total mondial des captures en eaux continentales est de nouveau remonté en 2003 et 2004 pour atteindre 9,2 millions de tonnes pendant cette dernière année. Comme précédemment, l'Afrique et l'Asie représentent environ 90% du total mondial et leurs parts respectives sont relativement stables. Les pêches continentales paraissent toutefois en crise en Europe où le total des captures a chuté de 30% depuis 1999. Le déclin de la pêche professionnelle peut être partiellement imputé à la concurrence d'autres formes d'exploitation des ressources hydriques continentales et à la moindre viabilité économique de nombreuses entreprises de pêche.

1.1.2. Production de l'aquaculture

L'aquaculture correspond à la culture de végétaux et d'animaux dans l'eau. Elle s'est considérablement développée dans certaines régions du monde. Au cours de la dernière décennie, la contribution croissante de l'aquaculture à la sécurité alimentaire, au recul de la pauvreté, aux moyens de subsistance des communautés rurales, à la création d'emplois et de source de revenus a été justement reconnue (FAO, 2003).

Selon les statistiques de la FAO, la contribution de l'aquaculture aux approvisionnements mondiaux de poissons, de crustacés, de mollusques et d'autres animaux aquatiques continue de progresser, passant de 3,9% de la production pondérale totale en 1970, à 27,1% en 2000 et 32,4% en 2004. L'aquaculture poursuit son essor à un rythme plus rapide que celui de tous les autres secteurs de production alimentaire d'origine animale.

En 2004, la production aquacole mondiale (poissons et plantes aquatiques) est déclarée à 59,4 millions de tonnes, pour une valeur de 70,3 milliards d'euros. Cela représente un accroissement annuel de 6,9% en volume et de 7,7% en valeur par rapport à l'année 2002. En 2004, les pays de la région Asie-Pacifique ont compté pour 91,5% de la production mondiale et 80,5% de sa valeur.

Le tableau I.2 donne le nom des 10 plus grands pays producteurs de poissons d'élevage destinés à la consommation pour la période 2002-2004. Toutes les régions ont enregistré un accroissement de leur production durant cette période, à l'exception du Japon avec une baisse de 3,1%.

Tableau I.2. : Production aquacole des 10 principaux producteurs de poisson ; volume et croissance émergente (FAO/SOFIA, 2006).

Producteurs	2002	2004	Taux de croissance annuel moyen
	(Tonnes)		(%)
Chine	27.767.251	30.614.968	5,0
Inde	2.187.189	2.472.335	6,3
Vietnam	703.041	1.198.617	30,6
Thaïlande	954.567	1.172.866	10,8
Indonésie	914.071	1.045.051	6,9
Bangladesh	786.604	914.752	7,8
Japon	826.715	776.421	- 3,1
Chili	545.655	674.979	11,2
Norvège	550.209	637.993	7,7
Etats-Unis	497.346	606.549	10,4
Sous-total 10 principaux producteurs	35.732.648	40.114.531	6,0
Reste du monde	4.650.830	5.353.825	7,3
Total	40.383.478	45.468.356	6,1

I.1.3. Utilisation du poisson

En 2004, environ 75% (soit 105,6 millions de tonnes) de la production mondiale de poisson ont été utilisés pour la consommation humaine. Les 25% restants, soit 34,8 millions de tonnes étant destinés aux produits non alimentaires, en particulier à la fabrication de farine et d'huile de poisson. 61% (soit 86 millions de tonnes) de la production mondiale de poisson a subi une transformation, dont 59% (51 millions de tonnes) concernant la fabrication de produits congelés, salés, fumés, ou en conserve. Le reste est utilisé pour des usages non alimentaires. Selon les estimations de la FAO, le volume de poisson vivant ou frais est passé de 35 millions de tonnes en 1994 à 55 millions de tonnes en 2004, soit un accroissement de 31% à 39% de la production totale. En 2004, la congélation est la première méthode de transformation. Elle représente 53% du volume total de poisson transformé, suivie de la mise en conserve (24%) et du saurissage (23%) (FAO/SOFIA 2006).

Le poisson est un bon aliment. On le classe dans le groupe 1, celui des aliments qui, à l'état brut, sont les plus riches en protéine, donc les aliments de croissance, de réparation, de stimulation dans les états de fatigue. C'est donc un aliment populaire bon et sain dont on a intérêt à développer l'élevage partout, la pêche ne pouvant assurer un approvisionnement bon marché (Arrignon, 1993).

1.1.4. Le commerce international du poisson

Le poisson est par nature une ressource globale, accessible dans toutes les eaux nationales et internationales de la planète, son marché évolue actuellement vers une interdépendance mondiale en matière d'approvisionnements. Le commerce des produits halieutiques est en effet devenu le plus internationalisé de tous les commerces de produits alimentaires.

Le commerce du poisson joue un rôle très important pour certains pays, notamment les pays en développement. Il représente une importante source de revenus, crée des emplois et assure la sécurité alimentaire. En 2004, les échanges internationaux de poissons ont représenté une valeur d'exportation de 71,5 milliards d'euros, soit une progression de 23% par rapport à 2000 et de 51% par rapport à 1994. En valeurs réelles (la valeur est corrigée par rapport à l'inflation), les exportations de poissons et de produits dérivés ont augmenté de 17,3% pendant la période 2000-2004, de 18,2% entre 1994 et 2004 et de 143,9% entre 1984 et 2004. Plusieurs facteurs ont contribué à cette croissance, par exemple l'évolution de la demande de certains produits, les progrès technologiques, les variations des prix et des taux de change.

Dans les pays développés, la part des exportations de poissons par rapport au commerce total était de l'ordre de 0,6 à 0,8% pendant la période 1976-2004. Par contre, dans les pays en développement, la part du poisson dans les exportations totales a augmenté dans les années 70 jusqu'à la fin des années 80 (2,3% en 1988), puis chuté à 1,2% en 2004.

A cause de la nature périssable du poisson et de ses produits dérivés, plus de 90% du commerce international des produits halieutiques sont des produits transformés. Le poisson vivant et le poisson frais sont très appréciés, mais très difficiles à commercialiser. De plus, le commerce du produit frais doit faire face aux règles sanitaires et aux normes de qualité strictes. Les exportations de poisson congelé ont augmenté au cours de la dernière décennie, passant de 28% du total des exportations de poisson en 1994 à 36% en 2004. Les exportations de poisson séché, salé et fumé occupent 5% du total des exportations en 2004, soit une légère baisse au cours de la dernière décennie (FAO/SOFIA 2006).

Le tableau I.3. donne les 10 premiers pays exportateurs et importateurs mondiaux de poisson et de produits dérivés en 1994 et en 2004. En 2004, la Chine s'est retrouvée (depuis 2002) au premier rang mondial des exportateurs de produits

halieutiques avec un chiffre d'affaire de 6,6 milliards d'euros. La Norvège, qui avait été le troisième exportateur mondial en 2002, devient le deuxième exportateur pour une valeur de 4,1 milliards d'euros. La Thaïlande, troisième exportateur mondial avec 4 milliards d'euros, était suivie des Etats-Unis (3,8 milliards d'euros), du Danemark (3,5 milliards d'euros) et du Viet Nam (2,4 milliards d'euros). Ce dernier, grâce à la croissance de sa production aquacole, a nettement augmenté ses exportations de poissons et de produits dérivés au cours de la dernière décennie, passant de 0,3 milliards d'euros en 1992 à 2,4 milliards d'euros en 2004.

Tableau I.3. : Principaux pays exportateurs et importateurs de produits halieutiques (FAO/SOFIA 2006).

Pays	1994	2004	Taux de croissance annuel moyen
	<i>(millions d'euros)</i>		<i>(%)</i>
Exportateurs			
Chine	2 320	6 637	11,1
Norvège	2 718	4 132	4,3
Thaïlande	4 190	4 034	-0,4
Etats-Unis	3 230	3 851	1,8
Danemark	2 359	3 566	4,2
Canada	2 182	3 487	4,8
Espagne	1 021	2 565	9,6
Chili	1 304	2 484	6,7
Pays-Bas	1 346	2 452	5,5
Viet Nam	484	2 403	17,4
Sous-total 10 principaux exportateurs	21 243	35 611	5,3
Total reste du monde	26 267	35 897	3,2
Total monde	47 511	71 508	4,2
Importateurs			
Japon	16 140	14 560	-1,0
Etats-Unis	7 043	11 967	5,4
Espagne	2 639	5 222	7,1
France	2 797	4 176	4,1
Italie	2 257	3 904	5,6
Chine	856	3 126	13,8
Royaume-Uni	1 880	2 812	4,1
Allemagne	2 316	2 805	1,9
Danemark	1 415	2 286	4,9
République de Corée	718	2 233	12,0
Sous total 10 principaux exportateurs	38 063	53 090	3,4
Total reste du monde	13 104	22 202	5,4
Total monde	51 167	75 293	3,9

I.2. Le poisson chat *Pangasius*

I.2.1. Généralités

Les poissons que nous étudions sont indigènes du Bas-Mékong. Ils appartiennent à l'ordre des Siluriformes (c'est le groupe des poissons-chats en général), sous-ordre des *Siluroidei*, famille des *Pangasiidae*, genre *Pangasius*. Les *Pangasiidae* sont des poissons tropicaux d'eau douce, dont l'aire de répartition globale se situe en Asie du Sud et du Sud-est, (Roberts et Vidthayon, 1991, Pouyaud *et al*, 2000). Malgré leur allure de squal, c'est-à-dire de requin, les poissons-chats sont des poissons inoffensifs. Omnivores, ils se nourrissent surtout de crustacés, de petits poissons et d'algues.

Presque toutes les espèces sont des poissons rhéophiles qui privilégient les eaux courantes des grands fleuves, où ils accomplissent des migrations vers l'amont à des fins de reproduction. Généralement ignorés des statistiques de production, les Pangasidés ont cependant une importance économique certaine dans les pays de la région. Ils ont donc une importance comparable aux deux autres grandes familles de poissons-chats que sont les *Clariidae*, produits en Afrique et en Asie, et les *Ictaluridae* (Channel catfish), produits en Amérique du Nord.

D'après Roberts et Vidthayanon (1991), les *Pangasius* se caractérisent par (Figure I.1) :

- Une paire de barbillons maxillaires et une seule paire de barbillons mandibulaires, absence de barbillons nasaux,
- des narines antérieures de taille similaire aux narines postérieures,
- la présence invariable d'une petite nageoire adipeuse,
- 6 ou 8-9 rayons sur la nageoire pelvienne,
- 8 à 9 rayons sur la nageoire caudale,
- 26 à 46 rayons sur la nageoire anale,
- 39 à 52 vertèbres.



Pangasius hypophthalmus (ca tra)

Pangasius bocourti (ca basa)

(Photos Lazard, 2005)

Figure I.1. : 2 espèces principales de poissons-chats du delta du Mékong.

Le Mékong compte 13 espèces de Pangasidés, qui présentent des caractéristiques variées, dont 8 sont des poissons de taille plutôt grande, atteignant au moins 50 cm de longueur et présentant un intérêt aquacole (Tableau I.4.). Parmi ces 8 espèces, deux sont géantes (*Pangasius gigas* et *Pangasius sanitwongsei*), elles peuvent atteindre 3 m et peser jusqu'à 300 kg.

Les Pangasidés vivent en eau douce, mais deux espèces sont euryhalines, i.e. tolérantes aux variations de salinité (*Pangasius krempfi* et *Pangasius mekongensis*), elles vivent dans l'estuaire du Mékong et remontent le fleuve en eau douce pour se reproduire (espèces anadromes). Les Pangasidés possèdent une respiration aérienne complémentaire, plus ou moins développée, grâce à une vessie natatoire particulière qui joue le rôle de poumon accessoire. Ainsi les Pangasidés et tout particulièrement *Pangasius hypophthalmus* sont-ils relativement tolérants vis-à-vis des faibles teneurs en oxygène de l'eau. Le régime alimentaire de ces poissons est omnivore avec une tendance phytophage ou carnassière en fonction des espèces. *Pangasius bocourti* est notamment réputé pour sa consommation importante de matières végétales avec une tendance frugivore marquée. Comme chez tous les poissons-chats, la chair des Pangasidés est dépourvue d'arêtes fourchues intramusculaires qui truffent généralement la chair de nombreux poissons d'eau douce comme ceux de la famille des *Cyprinidae*. La texture de la chair peut être fondante (*Pangasius bocourti*) ou plus ou moins ferme en fonction des espèces et de leur provenance. Sa saveur est généralement peu prononcée.

Tableau I.4. : Les *Pangasiidae* d'intérêt aquacole présents dans le delta du Mékong (Cacot et Lazard, 2004).

	Nom vietnamien	Appréciation par les consommateurs	Potentialités pour l'aquaculture ⁽¹⁾
<i>Pangasius krempi</i>	Ca bong lau	++++	0
<i>Pangasius mekongensis</i>	Ca tra ban	+++ /++++	+
<i>Pangasius hypophthalmus</i>	Ca tra	+ /++	++++
<i>Pangasius bocourti</i>	Ca ba sa	+++	+++
<i>Pangasius larnuadi</i>	Ca vo dem	+++	+
<i>Pangasius conchophilus</i>	Ca hu	+++	+
<i>Pangasius gigas</i>	Ca tra dau	Espèce rare	0
<i>Pangasius sanitwongsei</i>	Ca vo co	Espèce rare	0

⁽¹⁾ Potentialité pour l'aquaculture :

0 : aucune référence sur l'élevage de l'espèce

+: seuls *P. hypophthalmus* (++++) et *P. bocourti* (+++) ont fait l'objet d'élevages permettant d'évaluer le potentiel à grande échelle. Pour les autres espèces, seuls des essais très préliminaires ont été effectués (+).

1.2.2. La pangasiculture dans le delta du Mékong au Vietnam

Le Mékong prend sa source au Tibet et déroule ses 4 200 km à travers la Chine, le Laos, le long de la frontière Thaïlande-Laos, le Cambodge et le Vietnam. La totalité du delta se trouve à l'extrême sud du Vietnam. Avec un débit annuel de 500 milliards de mètres cubes, le Mékong est le troisième fleuve d'Asie et le huitième au niveau mondial.

Le delta du Mékong (35 000 km²) est une vaste zone agricole très productive due à son climat chaud et humide (température moyenne 28°C, minimum 22°C et maximum 35°C) et aux conditions hydrologiques favorables. La zone dispose cependant d'eau en permanence et de crues modérées ; le delta bénéficie d'une régulation du débit grâce au grand lac Ton Le Sap en amont au Cambodge. Le Ton Le Sap absorbe en effet une bonne partie de l'eau qu'il restitue ensuite en saison sèche, sa surface fluctue ainsi entre 3 000 et 12 000 km². Les remontées salines ne constituent un problème que sur la frange côtière du delta (jusqu'à 50 km à l'intérieur des terres), encore que la salinité soit mise à profit par les éleveurs de crevettes. Le delta était à l'origine un vaste marécage qui a été mis en valeur durant le 19^{ème} siècle et le début du 20^{ème}, principalement durant la colonisation française. Le delta est quadrillé par un réseau de plus de 5 000 km de canaux. L'essentiel de ce réseau a été creusé entre 1890 et 1930 et a permis de conquérir des terres à l'ouest de delta (Cacot, 1993).

Fort de ces bonnes conditions, le delta contribue aujourd'hui à la moitié de la production agricole du pays. Les agriculteurs pratiquent 2 ou 3 récoltes de riz par an. La production du riz dans le delta du Mékong permet d'assurer l'autosuffisance alimentaire du delta et la production est généralement suffisante pour également en exporter une partie. La production de riz tend cependant à diminuer au profit de la production fruitière (mangues, agrumes, goyave, longanes,...) plus rémunératrice. Les élevages sont également développés (monogastriques, porcs, volailles et poissons).

En raison d'un réseau dense de rivières, canaux, lacs et lagunes, l'aquaculture vietnamienne fut longtemps axée sur les poissons d'eau douce, d'abord dans le nord du pays avec des espèces de carpes, puis dans le delta du Mékong, berceau de la pisciculture des poissons-chats *Pangasidae*.

La production aquacole au Vietnam est estimée à 1 millions de tonnes en 2007 toutes espèces et tous milieux confondus. La production de *Pangasius* représente à elle seule presque 40% de ce total (380 000 t) et elle est entièrement localisée dans le delta du Mékong, au Sud du Vietnam (Vietnam Fisheries Information Center (FICen), 2008). Cette filière d'élevage que l'on fait remonter aux années 1970 pour ce qui concerne les cages flottantes a considérablement évolué depuis une dizaine d'années, du fait notamment des progrès en matière de recherche (domestication), de technologie (systèmes d'élevage, alimentation) et des exigences du marché (qualité).



Figure I.2. : Élevage en cages flottantes.
(Photo : Le Nguyen, 2006).

La filière reposait, jusqu'à la maîtrise de la reproduction en captivité (1995) des 2 principales espèces d'élevage (*Pangasius bocourti* ou « ca ba sa » en vietnamien et *P. hypophthalmus* ou « ca tra » en vietnamien), sur la capture d'alevins et de juvéniles dans le milieu naturel, principalement au Cambodge (Lazard et Cacot, 1997).

Au milieu des années 1990, on estimait la production de *Pangasius* dans le delta du Mékong à environ 50 000 tonnes se répartissant en 15 000 - 30 000 tonnes en cages flottantes et 30 000 tonnes en étangs extensifs, essentiellement constitués par les étangs « à latrines », système d'élevage traditionnel de tout le Sud - Est asiatique (de la Chine à l'Indonésie). La filière était également caractérisée par l'élevage de 2 espèces distinctes correspondant chacune à un système d'élevage et à un marché spécifique :

* *Pangasius bocourti* est le nouveau nom donné au *Pangasius pangasius* par Roberts et Vidthayanon (1991). Il peut atteindre 15 kg dans la nature. Il est doté d'une respiration aérienne. Son régime est omnivore. Il semble effectuer une longue migration jusqu'aux chutes de Khône au Laos pour sa reproduction. Il est élevé en cages flottantes. Ce poisson est caractérisé par une chair blanche, fondante et par la présence d'une importante masse de graisse périviscérale (jusqu'à 30% du poids vif).

* *Pangasius hypophthalmus* est le nouveau nom donné par Roberts et Vidthayanon (1991) au *Pangasius micronemus*. Il est encore confondu avec *Pangasius sutchi* qui est son synonyme le plus courant. Il peut atteindre 70 kg dans la nature. Il a en milieu naturel un régime omnivore à tendance phytophage (Lenormand, 1996) : détritiques, racines, crustacés, fruits, insectes, mollusques et poissons. Sa vessie natatoire fait office d'organe de respiration aérienne, ce qui lui permet de s'adapter à des conditions d'élevage où la teneur en oxygène dissout est très faible, à cause d'un empoissonnement important (cage) ou d'un faible renouvellement en eau (étang). Au Vietnam, ce poisson est sexuellement mature pendant la saison des pluies (juin à novembre). *Pangasius hypophthalmus* est capable de se reproduire à partir de deux ans pour les femelles, un an et demi pour les mâles (Huillery, 2001). Ce poisson est caractérisé par une chair jaunâtre, plus ferme que celle de *P. bocourti* et une masse de graisse périviscérale plus faible.

Jusqu'en 1995, la totalité de la production de poissons-chats du Mékong au Vietnam était basée sur la capture de juvéniles dans le milieu naturel, principalement dans la partie cambodgienne du fleuve. La première reproduction en captivité de ces 2 espèces intervient en 1995 à Can Tho et Chau Doc dans le cadre d'un programme de coopération scientifique mené par le CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement) en collaboration avec l'IRD (Institut de recherche pour le développement) et avec trois partenaires vietnamiens : deux universités et l'entreprise semi-publique Agifish (Cacot *et al.*, 2002 ; Cacot *et al.*, 2003). Elle a totalement « révolutionné » la filière en levant le principal verrou : l'approvisionnement en alevins et juvéniles devenu à la fois problématique sur le plan politique (durcissement des relations politiques et économiques entre le Cambodge et le Vietnam, notamment sur le sujet très sensible des ressources halieutiques) et économique (l'envolée du prix des alevins et juvéniles de *Pangasius* était tel que ce poste représentait, en 1995, jusqu'à 52% des coûts de production de *P. bocourti* en cages flottantes).

La reproduction en captivité a fait apparaître de profondes différences de caractéristiques biologiques entre les 2 espèces. *P. bocourti* (la plus recherchée pour l'exportation) a révélé 3 handicaps majeurs pour une production massive d'alevins en conditions contrôlées : maturation complète difficile en captivité nécessitant un traitement hormonal de « finition », faible fécondité (5 000 – 7 000 oeufs par kg de femelle) et élevage larvaire inféodé à des structures intensives avec première alimentation à base de proies vivantes (Hung *et al.*, 2001 ; Hung *et al.*, 2002). *P. hypophthalmus*, sur ces 3 points, s'est révélé beaucoup plus performant : bonne maturation en captivité, fécondité élevée (70 000 œufs par kg de femelle), bonne survie en élevage larvaire extensif en étang fertilisé. Ces caractéristiques biologiques ont induit en quelques années une totale substitution de la principale espèce d'élevage en cages flottantes destinée à l'exportation : *P. hypophthalmus* s'est substitué à *P. bocourti* et constitue aujourd'hui plus de 95% des *Pangasius* exportés. *P. bocourti* n'est plus élevé que marginalement.

La couleur de la chair et le goût de vase de *P. hypophthalmus* élevé en structures intensives ont été radicalement modifiés : chair blanche grâce à l'absence des pigments liés à l'alimentation naturelle en étangs extensifs et absence de goût de vase.

En 2007, la production totale de *Pangasius* destinée à l'exportation a atteint 312 000 tonnes avec la valeur de 790 millions USD (Figure I.3. et Tableau I.5.). Celle-ci est effectuée pour la plupart sous forme de filets congelés produits dans 25 usines du delta du Mékong. Ces filières ont employé plus de 35 000 personnes, dont au moins 20 000 pour l'élevage et 15 000 dans les usines de transformation.

Le poisson-chat *Pangasius* a connu au Vietnam un décollage réussi et un envol prometteur. Le poisson-chat est d'ailleurs devenu une véritable idole. A Chau Doc, la capitale de la région d'An Giang dans le delta du Mékong, il est vénéré. Des éleveurs lui ont dédié une statue de douze mètres de haut pour le remercier de leurs enrichissements.

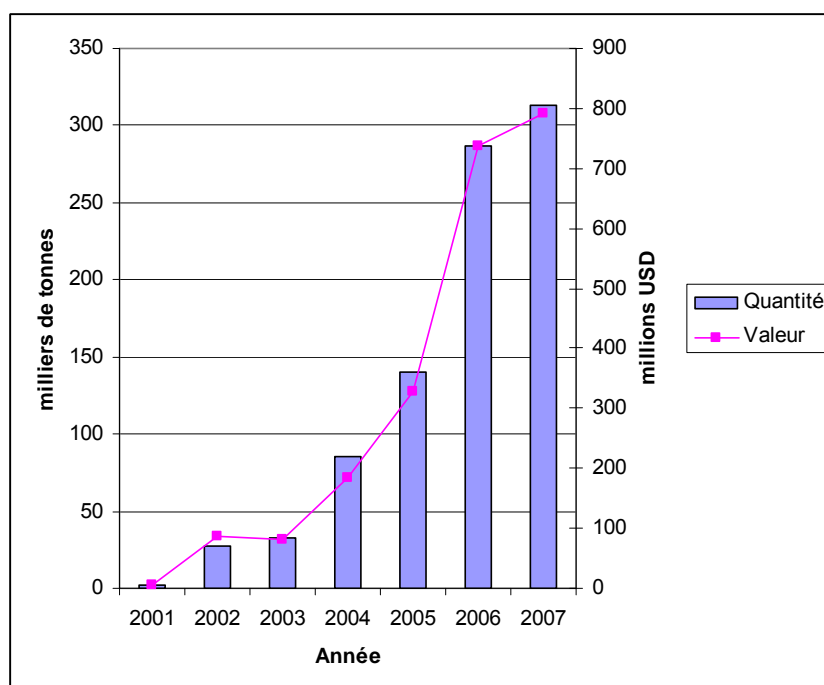


Figure I.3. : Exportation du *Pangasius* du Vietnam (en quantité et en valeur).

(Source : Vietnam Fisheries Information Center (FICen), 2008).

Tableau I.5. : Exportation du *Pangasius* du Vietnam (par marché).

Marché	2005		2006		2007	
	Quantité (1000 T)	Valeur (millions USD)	Quantité (1000 T)	Valeur (millions USD)	Quantité (1000 T)	Valeur (millions USD)
EU	55,1	139,3	123,2	343,4	141,6	392,2
USA	14,7	35,3	24,2	72,9	18,5	59,8
ASEAN	19,9	36,5	26,9	59,5	27,8	64,4
Russie	3,1	5,6	42,7	83,2	31,5	61,1
China	1,8	3,8	1,1	2,4	15,6	34,1
Autres	46,1	107,7	68,5	175,4	77,7	179
Total	140,7	328,2	286,6	736,8	312,7	790,6

(Source : Vietnam Fisheries Information Center (FICen), 2008)

1.2.3. La guerre du catfish

La guerre du «catfish » est une guerre commerciale entre les producteurs de poissons-chats vietnamiens et américains. Les Etats-Unis produisent des poissons-chats pour leur marché intérieur. Il s'agit du Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, appartenant à l'ordre des Siluriformes, famille des *Ictaluridae*. La production en 2001 de poissons-chats américains était de 270 000 tonnes. La même année le marché américain importait 13 475 tonnes de *Pangasius* vietnamien (Fisheries statistics Divisions, USA, 2001).

Cette guerre a débuté en 2001 lorsqu'un groupe de représentants de toute la filière du catfish américain accusa les *Pangasius* vietnamiens d'être élevés en conditions non hygiéniques. Un sénateur américain soutint que la consommation de ces poissons pouvait être dangereuse pour la santé humaine compte tenu de la grande quantité d'agent orange déversée dans le delta lors de la guerre du Vietnam. Cette plainte fut réfutée par l'Ambassade des Etats-Unis au Vietnam qui, après enquête, conclut à la salubrité des produits vietnamiens.

Le second épisode eut lieu en mai 2002 avec l'interdiction pour tout poisson ne faisant pas partie de la famille des *Ictaluridae* d'être commercialisé aux Etats-Unis sous le nom de « catfish ».

Nous pouvons nous interroger sur la légitimité d'une telle décision. Le mot anglais « catfish » est le nom commun désignant toutes les espèces de l'ordre des *Siluriformes* qui comprend les poissons-chats vietnamiens, européens et américains. Cette décision a été ressentie par les exportateurs vietnamiens comme une barrière non tarifaire. En réponse, le Vietnam Association of Seafood Exporters and Processors (VASEP) a lancé la marque commerciale *Pangasius* pour l'exportation des poissons-chats vietnamiens.

Après un an de débats et d'enquêtes, le dernier épisode a eu lieu en été 2003. Certains exportateurs vietnamiens ont en effet été accusés de pratiquer le dumping sur leurs produits et le département américain du commerce a statué sur le montant des taxes anti-dumping à appliquer aux poissons-chats vietnamiens. Celles-ci s'échelonnent entre 36 et 64%. Cette décision a conduit à une baisse des cours, d'au moins 50% en une année. Aujourd'hui les producteurs sont en difficulté et attendent que les cours remontent. Un de ses principaux marchés se fermant, la filière doit aujourd'hui trouver de nouveaux débouchés. Le VASEP se tourne donc vers le marché européen après l'avoir négligé pendant 10 ans.

I.3. Le Tilapia

I.3.1. Généralités

Les Tilapias appartiennent à la famille des Cichlidés et regroupent environ une centaine d'espèces. Ils forment désormais, à partir de quelques espèces endémiques africaines, la base de la pisciculture d'eau douce de la ceinture intertropicale du globe (Arrignon, 1993).

Les taxonomistes ont réparti ces espèces dans un certain nombre de petits groupes (Regan, 1920 ; Thys Van den Audenaerde, 1971). La plus récente classification par Trewavas (1982) divise les Tilapias en 3 genres :

- *Sarotherodon* pour lequel le male et la femelle pratiquent l'incubation buccale des œufs,
- *Oreochromis* pour lequel seule la femelle pratique ce type d'incubation,
- *Tilapia* pour lequel il n'y pas d'incubation buccale.

En élevage, seul le genre *Oreochromis* est largement représenté avec quatre espèces principales : *O. niloticus*, *O. aureus*, *O. hornorum*, *O. mossambicus* ainsi que le Tilapia rouge ou « Saint Pierre », issu du croisement de *O. mossambicus* mutant rouge mâle avec *O. hornorum* femelle (Lowe-McConnell, 1982). L'espèce piscicole la plus intéressante, le *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) est rencontrée dans tout l'ouest africain ainsi qu'en zone équatoriale.

Les Tilapias ont la capacité de vivre dans une grande variété d'eaux mais ce sont des poissons d'eau douce. Cette espèce est originaire de la Syrie et d'Egypte mais a été largement répandue en Afrique hors de sa zone d'origine pour compléter le peuplement des lacs naturels, des barrages déficients ou pauvres en espèces planctoniques ainsi que pour le développement de la pisciculture. Mais ces introductions ne se limitent pas à l'Afrique puisqu'on en trouve dans les lacs, fleuves et piscicultures un peu partout dans le monde comme en Amérique et en Asie (Welcome, 1988).

Ces poissons sont omnivores et digèrent la cellulose. Ils se nourrissent essentiellement de matières vivantes, mais leur alimentation peut être extrêmement variée.

Les espèces en milieu naturel se nourrissent principalement de phytoplanctons. En élevage, elles valorisent divers déchets agricoles comme le son

de riz, la farine basse de riz, les tourteaux d'oléagineux et acceptent facilement les aliments industriels sous forme de poudre ou de granulés (Arrignon, 1993).

Le Tilapia présente plusieurs atouts à l'industrialisation de la production, c'est un poisson robuste à la croissance rapide avec un haut taux de production. Il est tolérant à une grande variété de conditions et accepte l'encombrement du milieu par d'autres espèces. Le régime alimentaire est peu cher et il n'a pas besoin de beaucoup d'oxygène, ce qui permet des conditions de culture de haute densité. De plus, toute gamme d'élevage est possible et on observe un haut potentiel sur le marché.



Tilapia nilotica



Tilapia rouge

Figure I.4. : 2 espèces principales de Tilapia.
(Photos Ratnaporn, 2005)

1.3.2. Le marché des Tilapias

Les Tilapias (toutes les espèces et hybrides) est le deuxième groupe de poissons d'élevage après la carpe. Ils sont élevés dans au moins 85 pays, la plupart de la production venant d'Asie (Chine, Thaïlande) et d'Amérique Latine (Équateur, Honduras et Costa Rica).

La production mondiale de Tilapia va bientôt atteindre les 4 millions de tonnes. Cependant, la quantité du commerce mondial du Tilapia est relativement faible, environ 10%. Les Etats-Unis sont le marché mondial principal, alors que les importations de l'UE sont estimées à 10 000 – 15 000 tonnes seulement (Josupeit, 2008).

Tableau I.6. : Importation de Tilapia sur le marché américain
(par type de transformation) (Josupeit, 2008)

Type de transformation	2004	2005	2006	2007	Jan 2007	Juin 2008
	Milliers de tonnes					
Poisson entier congelé	57,3	56,5	60,8	46,9	26,6	25,6
Filet congelé	36,2	55,6	74,4	100,6	48,1	43,2
Filet frais	19,5	22,7	23,1	26,2	13,6	15,4
Total	112,9	134,9	158,8	173,7	83,3	84,2

Tableau I.7. : Importation de Tilapia sur le marché américain (par pays d'origine)
(Josupeit, 2008).

Pays d'origine	2004	2005	2006	2007	Jan 2007	Juin 2008
	Milliers de tonnes					
Chine	28,1	44,1	63,3	87,5	42,4	36,6
Indonésie	4,3	6,4	7,1	8,6	3,9	4,8
Taiwan	2,7	3,1	3,1	2,6	1,1	1,2
Thaïlande	0,7	0,9	0,2	0	0	0,1
Equateur	0,2	0,3	0,2	0,4	0	0,2
Vietnam	0	0,4	0	0,1	0	0
Panama	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1
Autres	0,1	0,3	0,2	1,2	0,6	0,2
Total	36,2	55,6	74,4	100,6	48,1	43,2

I.4. Le bar

I.4.1. Généralités

Le bar est un poisson Téléostéen, Perciforme, appartenant à la famille des *Serranidae* et au genre *Dicentrarchus*. Le genre *Dicentrarchus* renferme deux espèces : le bar commun (*Dicentrarchus labrax*) et le bar tacheté (*Dicentrarchus punctatus*).

Cette espèce erratique côtière est présente en Atlantique de 30° de latitude nord (Côte du Maroc) à 55° de latitude nord (Mer d'Irlande, Mer du Nord, Baltique). Elle est également présente sur toutes les côtes méditerranéennes (Barnabé, 1989) où elle est appelée Loup. Très ubiquiste, elle pénètre dans les lagunes côtières et l'embouchure des fleuves, qu'elle peut remonter sur plusieurs kilomètres.

Le bar mesure de 30 cm à 1m et pèse entre 5 et 7 kg. Il peut atteindre 1 m et peser jusqu'à 15 kg. Son habitat est le fond sableux, les rochers, les parois verticales, entre la surface et 50 m de profondeur. Sa période de reproduction est de janvier à mars en Méditerranée et de mai à août en Atlantique (Smith, 1990).

Avec un prix de vente à la production qui a dépassé les 100 F/kg depuis 1984 et une demande largement supérieure à l'offre, l'élevage du bar bénéficie d'un contexte économique particulièrement porteur. C'est heureux car les difficultés de l'élevage ne sont pas minces ; étant donné qu'il s'agit du premier poisson marin élevé à échelle commerciale en Europe, bien des choses restent encore à faire pour disposer d'une zootechnie de routine. En France, toutes les phases de la reproduction et de l'élevage jusqu'au stade juvénile sont protégées par un brevet (Bernabé, 1989) et exploitées par plusieurs organismes.



Figure I.5. : Bar (*Dicentrarchus labrax*)

(Photo Mattei, 2005)

1.4.2. Le marché du bar

Le bar est apprécié pour sa chair blanche délicatement parfumée. Il est généralement vendu entier, très rarement débité en tranches ou en filet. Dans ces derniers cas, il s'agit plus vraisemblablement d'un autre poisson (*Anarhichas lupus* ou poisson-loup), beaucoup moins goûteux. La réglementation (assez confuse) permet en effet de commercialiser ce dernier sous cette forme, avec la dénomination « filet de loup de mer » ou « filet de loup de l'Atlantique ». Certains professionnels abusent volontairement de cette confusion très rentable, puisque le prix de revient d'*Anarhichas lupus* peut être de deux à trois fois moins cher que celui du bar.

Un des plus grands succès dans l'histoire de l'aquaculture européenne est l'industrie d'élevage du bar en Méditerranée, qui, en moins de 20 ans, est passée de quelques mille tonnes à plus de 80 000 tonnes aujourd'hui (FAO Fisheries & Aquaculture *Dicentrarchus labrax*).

La Grèce reste toujours le producteur principal du bar, suivie de la Turquie, de l'Espagne et de l'Italie (Tableau I.8).

Tableau I.8. : Production mondiale du bar (*Dicentrarchus labrax*) (FAO 2006).

Pays	2001	2002	2003	2004	2005	2006
			(Milliers de tonnes)			
Grèce	25,6	24,3	25,4	27,0	36,1	34,0
Turquie	16,7	15,1	21,7	15,0	21,1	29,0
Italie	12,2	10,6	13,0	9,0	8,6	9,0
France	6,9	7,6	9,0	3,8	4,3	5,0
Espagne	2,9	3,9	4,6	6,2	8,5	7,3
Egypte	1,6	2,6	3,2	NA	NA	NA
Croatie	1,6	1,8	1,8	NA	1,9	1,9
Portugal	1,0	0,9	1,4	1,5	1,5	1,5
Tunisie	0,5	0,6	0,5	NA	NA	NA
Autres	1,9	2,3	3,2	0,5	0,5	0,8
Total	70,8	69,7	83,8	83,0	82,5	88,5

I.5. Diversité de la flore microbienne du poisson

La flore microbienne du poisson est en relation directe avec l'environnement aquatique dans lequel il évolue. La flore microbienne du poisson fraîchement pêché dépend plus de l'environnement dans lequel il a été capturé que de l'espèce du poisson (Shewan, 1977). Elle est essentiellement répartie dans les viscères, la cavité buccale et les branchies, ainsi que sur la peau du poisson.

I.5.1. Les bactéries des œufs du poisson

Les œufs du poisson sain sont stériles avant d'être fécondés. Ensuite, les œufs sont normalement colonisés par des flores bactériennes présentes dans l'eau (RingØ et Birkbeck, 1999). La surface glycoprotéineuse de la coquille des œufs est bien appropriée à l'adhérence et la colonisation des bactéries. Parce que l'oxygène est nécessaire pour l'éclosion, une grande quantité de bactéries à la surface des œufs peut aussi influencer l'éclosion. D'autres dangers pour la croissance des embryons peuvent être dus à la présence d'enzymes protéolytiques extracellulaires, les exotoxines libérées par l'épiflore (Hansen et Olafsen, 1999). Les œufs de morue de l'Atlantique sont normalement colonisés par *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Aeromonas* et *Flavobacterium* (Hansen et Olafsen, 1999).

I.5.2. Les bactéries de la larve du poisson

L'épiderme et l'intestin de la larve sont stériles jusqu'à l'éclosion, puis ils sont colonisés par les bactéries aquatiques (Campbell et Buswell, 1983). Les bactéries

qui colonisent d'abord l'appareil gastro-intestinal des larves de poissons proviennent de l'épiflore résidente sur l'œuf à l'heure de l'éclosion, et des bactéries de l'eau (Hansen et Olafsen, 1999). La prise d'aliment intervient rapidement après l'ouverture de la bouche et elle donne un libre accès à tous les micro-organismes présents dans l'aliment et dans l'eau à l'intestin du poisson. Une fois que l'alimentation commence, la flore intestinale dérive plus de l'alimentation que des bactéries présentes dans l'eau. En raison de l'immaturité du système immunitaire de la larve du poisson, les défenses se fondent sur un mécanisme de défense non spécifique, dont les flores microbiennes intestinales intimement liées avec le mucus intestinal établissent une barrière primaire. La flore microbienne primaire sera donc établie à l'étape larvaire et se développera en flore persistante à l'étape juvénile ou après métamorphose (RingØ et Birkbeck, 1999).

Quand le poisson se développe, la flore bactérienne doit s'adapter à des conditions variables comme la composition des aliments, le pH, l'anaérobiose, la concentration des sels biliaires et les enzymes digestives, ainsi que l'influence mutuelle d'autres genres de la communauté bactérienne intestinale (Hansen et Olafsen, 1999). En général, *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp. et les bactéries du groupe de *Flavobacterium* / *Cytophaga* sont les bactéries les plus communes dans les intestins des poissons d'eau douce (RingØ et Birkbeck, 1999). Quelques recherches indiquent la présence de bactéries lactiques dans les intestins de la larve du poisson (Kvasnikov *et al.*, 1977 ; RingØ et Birkbeck, 1999).

1.5.3. Les bactéries du poisson mature

La microflore du poisson est en relation directe avec l'environnement aquatique. Différentes espèces pêchées dans les mêmes lieux à la même saison, présentent la même microflore contaminante, alors que celle-ci diffère si les lieux de pêche sont différents (Sainclivier, 1983a). La microflore bactérienne du poisson reflète l'eau environnante parce que l'eau est le véhicule de la pollution. Des apports extérieurs : terre, débris organiques, pluies, ruissellement, déversements, marées, ... sont des vecteurs de contamination microbienne.

La chair du poisson sain, vivant ou fraîchement pêché est stérile car la peau fait barrière et le système immunitaire du poisson empêche les micro-organismes de

se multiplier dans sa chair. Les régions contaminées sont les branchies, le mucus qui recouvre la peau et le tube digestif (Guiraud, 1998). Le nombre de microorganismes varie énormément de 10^2 à 10^7 UFC/cm² de surface de peau (Liston, 1980) et de 10^3 à 10^9 UFC/g dans les branchies ou les intestins (Shewan, 1962).

La flore microbienne intestinale du poisson reflète également la charge bactérienne de la nourriture ingérée et de l'environnement (Hansen *et al.*, 1992). Dans le saumon, avec un pH de 3,5 à 4,5 dans l'estomac, le niveau de population bactérienne est dans la gamme de $2 \cdot 10^4$ à 10^5 (Austin et Al-Zahrani, 1988, RingØ, 1993a). Des recherches ont étudié les genres bactériens adhérents au système gastro-intestinal. Trust et Sparrow (1974) ont trouvé un grand nombre de bactéries hétérotrophes aérobies liées à l'appareil gastro-intestinal des saumons au Canada. Ces résultats ont été confirmés plus tard sur la sole de Couvres, *Solea solea* L. (Mac Donald *et al.*, 1986) et le char arctique (RingØ, 1993b). RingØ et StrØme (1994) ont trouvé une quantité constante de bactéries liées au petit et grand intestin du char arctique.

Des études japonaises ont décelé une charge élevée de bactéries dans l'appareil gastro-intestinal du poisson bien supérieure à celle des eaux environnantes, ce qui indique la présence d'une niche écologique favorable à ces bactéries (Muroga *et al.* 1987). De même, Larsen *et al.* (1978) ont trouvé jusqu'à 10^7 UFC/g de bactéries du type *vibrio* dans l'appareil intestinal du cabillaud et Westerdahl *et al.* (1991) en ont isolé un grand nombre dans les intestins du turbot.

I.6. Facteurs influençant la diversité de la microflore bactérienne du poisson

I.6.1. Influence de la qualité de l'eau

La contamination par les égouts des eaux littorales implique la prédominance des bactéries à Gram négatif dans l'eau. Les genres *Escherichia*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Enterococcus* et/ou *Clostridium* y sont particulièrement bien représentés. Des niveaux de populations microbiennes importants, de l'ordre de 10^7 UFC/cm² ont été trouvés sur les poissons provenant d'eau chaude polluée. Dans les eaux polluées, on peut trouver des charges élevées d'*Enterobacteriaceae*. Ces microorganismes disparaissent toutefois rapidement dans les eaux propres (Huss, 1995a). Ainsi, Gonzalez *et al.* (2001) ont pu mettre en évidence une différence importante de prédominance d'*Aeromonas* mésophiles dans la flore de poissons

d'eau douce provenant de rivières urbaines soumises à la pollution par rapport aux mêmes poissons élevés en aquaculture contrôlée dans la même région.

1.6.2. Influence de la salinité de l'eau

Sainclivier (1983a) indique que les saumons subissent des variations de composition de leur flore intestinale directement reliées à la salinité des eaux qu'ils traversent. Selon que le poisson provient d'eau douce ou d'eau de mer, les espèces bactériennes qui vont coloniser le tube digestif sont différentes. Ainsi, le genre halophile *Vibrio* spp. est plus fréquemment rencontré chez les poissons d'eau salée que dans les poissons d'eau douce (Varma *et al.*, 1989 ; Hörmansdorfer *et al.*, 2000) et l'on observe l'inverse pour le genre *Aeromonas* spp. (Gram *et al.*, 1990). Cependant, bien que l'espèce *Shewanella putrefaciens* soit caractérisée par son besoin en sodium, on peut également isoler des souches de *S. putrefaciens* dans des environnements d'eau douce (Spanggaard *et al.*, 1993 ; DiChristina et DeLong, 1994).

1.6.3. Influence de la température de l'eau et des saisons

La température de l'eau influence également la prédominance de telle ou telle espèce bactérienne. Le poisson capturé dans des eaux propres et froides a une charge bactérienne plus faible que celle du poisson capturé dans les eaux chaudes. Plusieurs espèces de bactéries se trouvent à la surface du poisson. Elles se classent en psychrotropes, psychrophiles ou mésophiles selon leurs intervalles de température de croissance. Les psychrophiles ont un optimum de croissance autour de 15°C avec une température maximale de croissance proche de 20°C, mais ils peuvent encore vivre et se multiplier à 0°C. Les psychrotrophes sont capables de se développer à 0°C mais avec un optimum aux environs de 25°C. Les mésophiles qui croissent à des températures comprises entre 25 et 40°C sont isolés en nombres importants à partir des poissons des eaux plus chaudes. La microflore des poissons d'eaux tempérées est dominée par les bactéries psychrotrophes à Gram négatif en forme de bâtonnets appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella* et *Flavobacterium*. Les membres de la famille des *Vibrionaceae* (*Vibrio* et *Photobacterium*) et des *Aeromonadaceae* (*Aeromonas* spp.) sont aussi des bactéries aquatiques courantes et typiques de la flore du poisson. Des bactéries à Gram positif comme *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*,

Lactobacillus peuvent être également trouvées en quantité variable, mais ce sont généralement les bactéries à Gram négatif qui prédominent (Huss, 1995a).

Les variations saisonnières de la température peuvent influencer aussi la diversité de la flore microbienne des poissons.

Fernandes *et al.* (1997) ont montré que les dénombrements d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* sur des filets de poissons chats d'aquaculture prélevés dans le même bassin durant les 4 saisons étaient significativement plus faibles l'hiver que l'été et qu'à l'inverse les bactéries psychrophiles étaient plus nombreuses en hiver.

1.6.4. Influence du régime alimentaire

Le régime alimentaire joue un rôle important dans l'établissement de la flore intestinale du poisson. Cependant, des changements de régime ont peu d'effet sur la population de la flore microbienne de l'intestin (Cahill, 1990). De plus, les bactéries intestinales du poisson peuvent être influencées par des probiotiques inclus dans les aliments. Les probiotiques sont des préparations de microbes vivants qui, une fois ingérés à concentration assez forte, vont affecter la santé des poissons en inhibant plusieurs microbes pathogènes (Gildberg *et al.*, 1997 ; Byun *et al.*, 1997). Les probiotiques les plus utilisés sont des *Carnobacterium divergens* (RingØ et Gatesoupe, 1998), des *Lactobacillus rhamnosus* (Nikoskelainen *et al.*, 2001) et des *Weissella hellenica* (Cai *et al.*, 1998).

1.6.5. Influence de l'utilisation des antibiotiques

Un paramètre capable de modifier considérablement l'équilibre de la population bactérienne est l'utilisation d'antibiotiques, très répandue et même abusive dans les pays en voie de développement (Sarter *et al.*, 2007). L'antibiotique peut sélectionner la population bactérienne. Le transfert potentiel des gènes de résistance des bactéries vers les animaux ou les humains peut se produire sur la chaîne alimentaire (Van den Bogaard et Stobberingh, 2000 ; Teuber, 2001).

Sarter *et al.* (2007) ont montré une grande résistance aux antibiotiques des bactéries des *Pangasius* du Vietnam. Actuellement, une antibiorésistance multiple a été trouvée dans un éventail de bactéries pathogènes ou opportunistes comme *Campylobacter* spp. (Randall *et al.*, 2003), *Klebsiella pneumoniae* (Carneiro *et al.*,

2003), *Salmonella* sp (Randall *et al.*, 2004) et *Pseudomonas aeruginosa* (Ziha-Zarifi *et al.*, 1999).

1.6.6. Influence des facteurs dans les procédés de transformation

1.6.6.1. Effet du froid

Effet de la réfrigération : Un froid modéré (0 à 4°C) ne permet pas la destruction des bactéries, mais il provoque un ralentissement important du métabolisme (croissance et transformation) des germes non psychrophiles ou psychrotrophes (Guiraud, 1998). Pour les germes thermophiles, une meilleure survie dans les aliments peut aussi être observée. Ainsi, il a été montré que des *Campylobacter jejuni* inoculés dans une gamme d'aliments crus et transformés durant un stockage à des températures allant de 2 à 20°C survivaient mieux aux températures les plus basses (Curtis *et al.*, 1995). Cependant, pour les poissons conservés sous glace, la quantité des bactéries double pratiquement chaque jour et après 2 à 3 semaines, elles atteignent 10^8 - 10^9 UFC/g de chair (Huss, 1995b).

Effet de la congélation : La congélation est un procédé qui consiste à abaisser la température au cœur du poisson en dessous des températures de cristallisation. La congélation modifie les conditions de vie des microorganismes : augmentation du pH, diminution de l'eau disponible et des teneurs en éléments nutritifs. Elle agit aussi sur la perméabilité des membranes, ce qui expliquerait que les bactéries à Gram négatif soient plus sensibles au froid que les bactéries à Gram positif (Farell et Upton, 1978 ; Sheridan, 1982). Au dessous d'un certain seuil, la croissance des bactéries devient impossible. L'application de température inférieure à -18°C bloque le métabolisme de toutes les bactéries et provoque même la destruction de certains germes selon la durée d'entreposage, la vitesse de congélation et la nature du milieu (Guiraud, 1998).

De nombreux facteurs peuvent influencer la survie de bactéries au cours de la congélation. La phase de croissance des bactéries est un facteur important, les bactéries en phase stationnaire ont une résistance plus importante à la congélation que celles en phase exponentielle (Mackey *et al.*, 1980). Une congélation rapide à -70°C détruit *in vitro* 80% des *Pseudomonas aeruginosa*, 30% des *Escherichia coli* initialement présentes mais est sans effet sur *Staphylococcus aureus* ni sur les spores de *Bacillus megaterium* (Sainclivier, 1993).

Lund (2000) a aussi étudié la sensibilité de *Staphylococcus aureus* à la congélation sur des aliments différents comme le lait, la viande de bœuf et le poulet. Une réduction de 1 log des germes de *S. aureus* a été observé après stockage plusieurs mois à -22°C. Les psychrophiles (*Achromobacter*, *Flavobacterium*) résistent bien aux basses températures. D'autres germes mésophiles comme les *Vibrio* peuvent survivre au froid négatif jusqu'à -200°C (Nascumento *et al.*, 1998). L'influence du temps de stockage est aussi connue et des études ont montré que la majeure partie de la destruction ou des dommages aux cellules bactériennes se produit pendant les étapes initiales du stockage, par exemple 1 ou 2 semaines (Speck et Ray, 1977).

Les études sur la susceptibilité des cellules végétatives de *Clostridium perfringens* à la congélation suggèrent que la matrice des aliments est importante pour la survie ou la mort des bactéries. Dans des viandes inoculées avec *C. perfringens* et congelées à -29°C, le nombre de germes viables a été réduit de 89,5% en 42 jours. La même étude réalisée en utilisant le milieu de Ellner comme matrice donne 99,5% de réduction pour la même durée de stockage (Trakulchang et Kraft, 1977). La matrice alimentaire affecte donc la survie des microorganismes lors de la congélation.

L'effet létal des phases de congélation et de décongélation est augmenté par les cycles de congélation/décongélation répétés en cours d'entreposage qui soumettent les membranes à une succession de stress importants.

Geiges (1996) a étudié la réduction de la population d'*E. coli* et d'autres microorganismes au cours de la répétition des 4 cycles de congélation/décongélation et a constaté une diminution du nombre de germes d'*E. coli* mais cette diminution varie selon le milieu de culture utilisé. Par contre, l'influence des cycles de congélation/décongélation sur les *S. aureus* et *S. cerevisiae* a été moins remarquable.

Plusieurs études ont montré une meilleure résistance à la congélation des cellules bactériennes si ces bactéries sont mises au froid peu de temps avant la congélation pour une adaptation. Le travail de Bollman *et al.* (2001) a prouvé que l'adaptation pendant 1h30 min avant la congélation améliore la viabilité des cellules d'*E. coli* après 28 jours de stockage à -20°C.

Sanders *et al.* (1999) ont montré que l'adaptation antérieure à 8°C pendant 48h a permis une meilleure survie des bactéries lactiques après la congélation. Berry

et Foegeding (1997) ont également indiqué les effets positifs de l'adaptation antérieure à 10°C pendant 6h avant la congélation des cellules d'*E. coli*.

1.6.6.2. Effet du traitement thermique

Les traitements thermiques par la chaleur entraînent la destruction totale ou partielle des microorganismes selon son intensité et les conditions de son utilisation. Les microorganismes pathogènes sont en général peu thermorésistants. Les bactéries sporulées sont plus thermorésistantes que les bactéries non sporulées. Toutefois, il existe des variations de thermorésistance des spores au sein d'une même espèce et entre espèces (Pendurka et Kulkarni, 1990).

Mulack *et al.* (1992) ont caractérisé les flores bactériennes après traitement thermique de filets de lieu noir et de terrines de poisson. Après une pasteurisation de 15 min à 60°C, la flore des filets de lieu noir se compose principalement de *Pseudomonas paucimobilis*, *Pseudomonas putida* et *Micrococcus varians*. Dans les terrines de poisson, la microflore totale aérobie est restée abondante après un chauffage de 5 min à 70°C et *Enterococcus faecium* est la principale bactérie non sporulée vivante. Par ailleurs, on observe dans les deux cas une nette augmentation de la proportion de bactéries à Gram positif, ce qui est normal compte tenu de leur plus grande thermorésistance.

L'effet de la pasteurisation à la vapeur et par immersion dans l'eau chaude sur les bactéries de la viande du poulet a aussi été étudié. Une immersion dans l'eau chaude à 80 et 85°C pendant 20 sec a conduit à des réductions logarithmiques significatives de respectivement 1,09 et 1,25 UFC/g des bactéries totales. En revanche, le traitement à la vapeur à 90°C pendant 12 sec n'a pas réduit de façon significative les bactéries totales, la réduction des bactéries totales n'est observée que pour un temps de traitement à la vapeur de 24 sec (Whyte *et al.*, 2003).

1.6.6.3. Effet du séchage et du salage

Le technique du séchage à froid (température environ 40°C) stabilise le produit par la diminution de la proportion « d'eau libre » contenue dans l'aliment. L'eau libre est l'eau disponible pour le développement des microorganismes. L'abaissement de l' a_w a un effet inhibiteur sur la croissance et la toxinogénèse, mais pas un réel effet destructeur sur la flore présente. Le séchage à chaud (température

en surface pouvant dépasser 100°C) agit également sur la destruction des microorganismes.

Un salage est souvent réalisé en complément du séchage pour son pouvoir inhibiteur sur certains pathogènes.

Lakshmanan *et al.* (2002a) ont montré que les bactéries halophiles formatrices d'amines (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Flavobacterium* et *Photobacterium*) ont disparu sur les filets de sardine (*Sardinella gibbosa*) salées-séchées immergées dans une solution de sel à 25% pendant 24h et séchées au soleil pendant 3 jours.

1.6.6.4. Effet du fumage

Le fumage traditionnel du poisson est un traitement englobant séchage, fumage et parfois salage. Les composés de la fumée du bois sont connus pour leurs propriétés antiseptiques et bactériostatiques, en particulier les phénols et certains acides organiques comme l'acide acétique. Ces composés se déposent à la surface du filet et diffusent dans les tissus. Dans la pratique moderne, le fumage est surtout utilisé à des fins organoleptiques plus que comme moyen de conservation (Sainclivier, 1983b).

Il existe deux techniques de fumage : le fumage à froid (température inférieure à 25°C) et le fumage à chaud (température en surface pouvant dépasser 100°C). Dans le cas du fumage à froid, on ne cherche pas une destruction de la flore d'altération, mais une prolongation de la conservation par combinaison de facteurs (léger séchage et salage, conservation à l'abri de l'air, présence de phénols et température de stockage inférieure à 4°C) (Knockaert, 1990).

Sabanadesan *et al.* (2000) ont étudié la survie de *Listeria innocua* dans le saumon fumé à froid et ont montré qu'il y a pas d'effet significatif de la température de fumage (18 à 30°C) sur la diminution du nombre de *Listeria innocua* présentes mais qu'il existe un effet significatif du temps de fumage. Une durée de fumage supérieure à 12 h entraîne 3 réductions logarithmiques de la population initialement présente sur le poisson.

Jemmi et Keusch (1992) ont prouvé que *Listeria monocytogenes* a été éliminée après un fumage à chaud à 65°C pendant 20 min, et n'a pas été retrouvée après 20 jours de stockage. Poysky *et al.* (1997) ont aussi trouvé que la température létale pour *L. monocytogenes* était 67,2°C si le fumage était appliqué au cours du séchage.

1.6.6.5. Effet du marinage (acidification)

Le marinage des produits alimentaires utilise souvent des acides organiques tels que l'acide acétique, l'acide lactique ou l'acide citrique (Sainclivier, 1983b). Un trempage dans un bain de marinage permet d'atteindre rapidement un pH inférieur à 4,5, malgré le pouvoir tampon des protéines de la viande ou du poisson. Les acides peuvent provoquer une dénaturation des enzymes et des protéines, et ainsi provoquer des perturbations de la perméabilité membranaire des bactéries. Les acides agissent indirectement par la baisse du pH, mais certains acides ont un effet bactéricide propre lié à la molécule, comme par exemple l'acide acétique utilisé à forte dose dans le marinage.

Le travail de Salam (2008) sur l'effet du marinage à 2 et 3% d'acide acétique sur la qualité microbienne de la morue pacifique a montré une réduction significative de la croissance des bactéries aérobies et des bactéries lactiques. L'inhibition complète de la croissance des Enterobacteriacées et des Staphylocoques a été obtenue dans des filets marinés à l'acide acétique à 3% et 2% après 30 et 50 jours de stockage, respectivement.

Il existe une variabilité dans la tolérance à l'acidification entre les espèces bactériennes. Lin *et al* (1995) ont étudié la survie de plusieurs membres de la famille des Entérobactéries à différentes concentrations en acide. Certaines bactéries comme *E. coli* et *S. flexeneri* sont capables de survivre à des niveaux de pH très faible (2 à 2,5) dans les milieux complexes. Par ailleurs, *S. typhimurium* est capable de survivre jusqu'à pH 3.

1.6.6.6. Effet synergique par association de différents procédés.

La combinaison de plusieurs procédés peut avoir une influence importante sur la létalité des bactéries. Ellasjosyula *et al.* (1998) montrent un effet conjugué des valeurs du pH de fermentation, de la température et du temps de chauffage sur la destruction d'*Escherichia coli* O157 :H7 et de *Salmonella typhimurium* dans des saucisses de type Lebanon Bologna. La fermentation seule entraîne 2 réductions logarithmiques de la population des 2 pathogènes, et le chauffage seul entraîne 3 réductions logarithmiques de la population. Cependant, la combinaison de la fermentation à pH 4,7, suivie par un chauffage à 48,9°C pendant 3h conduit à 7 réductions logarithmiques de la population des 2 pathogènes. Dans une étude sur le même produit (saucisses fermentées de type Lebanon Bologna), Chickthimmah *et*

al. (2001) ont étudié l'influence du chlorure de sodium en combinaison avec la fermentation sur la survie d'*Escherichia coli* O157 :H7. La fermentation à pH 4,7 à 37°C a réduit la population d'*E. coli* O157 :H7 d'environ 0,3 log avec ou sans sel. La destruction d'*E. coli* O157 :H7 pendant le chauffage d'un produit fermenté à 46,1°C a été significativement réduite en présence de 3,5% de NaCl et 156 ppm de NaNO₂ en comparaison avec les produits sans traitement salin.

Clavero et Beuchat (1996) ont étudié l'influence du pH (6, 5,4 et 4,8), de l'activité de l'eau (0,90 à 0,99) et de la température (5 à 37°C) lors de la fabrication du salami sur la survie d'*E. coli*, ainsi que les interactions entre ces facteurs. Ils ont montré ainsi que les cellules bactériennes étudiées survivent mieux à 5°C qu'à 20 ou 30°C mais que l'inhibition de la croissance a été augmentée par une diminution du pH ou de l'activité de l'eau.

I.7. La traçabilité

I.7.1. Définition

La traçabilité est un processus qui permet de retrouver un produit ou un service depuis sa création jusqu'à sa destruction. Plusieurs définitions ont été données à la traçabilité dont voici les plus importantes.

La traçabilité est définie par l'Organisation internationale de normalisation (ISO 9000-2000) comme « *l'aptitude à retrouver l'historique, la mise en œuvre ou l'emplacement de ce qui est examiné. Dans le cas d'un produit, elle peut être liée à l'origine des matériaux et composants, l'historique de la réalisation, la distribution et l'emplacement du produit après livraison* » (ACTA-ACTIA, 1998).

Selon la version de la norme ISO 8402-1984, la traçabilité est « *l'aptitude à retrouver l'historique, l'utilisation ou la localisation d'un article ou d'une activité, ou d'article et d'activité semblables, au moyen d'une identification enregistrée* ».

La traçabilité est un instrument de sécurisation des aliments et aussi un outil de gestion et de rationalisation de la chaîne de valeur alimentaire. La traçabilité ne s'applique pas toujours globalement. Il peut y avoir différents modes d'utilisation de la traçabilité. Selon que l'on s'intéresse à l'origine ou à la destination des produits, on parle de traçabilité ascendante ou descendante (Green et Hy, 2002).

La traçabilité ascendante permet, à tous les stades, à partir d'un lot de produit fini, de retrouver l'historique et l'origine du lot. Ainsi, grâce aux enregistrements des données, de l'étalonnage des outils, des procédures de contrôle et des résultats, il

est possible de retrouver l'origine d'une défaillance survenue au cours du transport, de la transformation, voire de la production de la matière première agricole.

La traçabilité descendante ou avale consiste à retrouver la destination industrielle ou commerciale d'un lot de produits agricoles : stockage chez le fabricant, livraison sur le lieu de vente, mise en linéaire. Là aussi, grâce aux enregistrements des données et aux contrôles spécifiques, le problème sur un lot peut être limité.

La traçabilité alimentaire fait actuellement l'objet de débats dans différents Comités du Codex Alimentarius. Un congrès de deux jours réunissant pour la première fois légistes et scientifiques a été organisé à Montpellier pour analyser, comprendre le sens et les implications du règlement européen CE N° 178/2002 (Gérard *et al.*, 2004). Un bon nombre d'experts estiment que la définition ISO actuelle de la traçabilité couvre un champ trop large pour être utilisée dans le contexte spécifique de la chaîne alimentaire. Le Comité du Codex Alimentarius pour le poisson et les produits de la pêche a convenu d'utiliser le terme « traçage du produit » à la section 3.7 du projet de Code des usages adopté par la Commission du Codex. Néanmoins, l'utilisation et définition définitive des termes de traçabilité ou de traçage du produit dépendront de l'issue des débats au sein du Comité du Codex sur les principes généraux (Comité des pêches, 2004).

Le Règlement CE N° 178/2002 définit la traçabilité comme étant : « *la capacité de retracer, à travers toutes les étapes de la production, de la transformation et de la distribution, le cheminement d'une denrée alimentaire, d'un aliment pour animaux, d'un animal destiné à la production de denrées alimentaires ou d'une substance destinée à être utilisée à cet effet* ». Le règlement exige aussi que les fournisseurs et les clients de chaque lot soient identifiables et que les opérateurs du secteur industriel mettent en place des systèmes pour faciliter l'accès des inspecteurs à ces informations. Les produits alimentaires circulant sur le marché doivent être également étiquetés pour faciliter leur traçabilité.

Avec ce règlement, la traçabilité devient une obligation réglementaire qui s'ajoute à une autre obligation : celle de mettre sur le marché des denrées sûres.

1.7.2. Importance de la traçabilité en agro-alimentaire

La traçabilité est un terme générique qui recouvre différents concepts : sécurité, transparence de l'origine des produits, loyauté des transactions

commerciales et la qualité en général. Dans de nombreux cas, elle restait une démarche volontaire qui s'inscrivait dans un souci de confiance et de qualité d'un produit ou d'un service pour le consommateur (ACTA-ACTIA, 1998). Il est maintenant nécessaire pour les producteurs, *a minima*, de garantir la sûreté de leurs produits et d'y ajouter la traçabilité. En plus d'une obligation légale, la traçabilité peut avoir des retombées sur le marketing et être un avantage pour son commerce. La confiance du consommateur signifie un meilleur marché, un meilleur prix. Le coût de traçabilité peut être remboursé.

La traçabilité est aujourd'hui devenue la préoccupation constante pour tous les acteurs de la chaîne alimentaire. Les producteurs, transformateurs, distributeurs doivent identifier et résoudre les points critiques, respecter les réglementations, effectuer des autocontrôles (Règlement CE N° 2073/2005) ; les services publics doivent établir et faire respecter les réglementations relatives à la maîtrise de l'hygiène ; les consommateurs doivent être informés de la nature des produits.

Durant les deux dernières décennies, de nombreux scandales et crises ont secoué le secteur agro-alimentaire. Les problèmes liés aux crises de la listériose, de la vache folle, des dioxines et le rejet des OGM (organismes génétiquement modifiés) attirent l'attention du consommateur sur le problème de sa qualité de vie et de la qualité de ses aliments. L'obligation d'informer le consommateur lors d'un problème sanitaire a créé un climat de méfiance du consommateur vers l'industriel (Règlement CE N° 178/2002). Le consommateur est donc demandeur du développement du principe de précaution ainsi que de techniques sécuritaires vis-à-vis de la production et de la commercialisation des aliments. Le marché des denrées alimentaires s'étant largement globalisé, du moins dans les pays industrialisés, les différentes crises ont amené un bon nombre d'entreprises à mettre en place des systèmes de traçabilité pour répondre à leurs besoins propres et pour satisfaire les besoins du client. Les entreprises ont recours à la traçabilité administrative, un instrument très développé pour rassurer d'avantage les consommateurs par rapport à la qualité d'un produit tout au long de la chaîne de production et de transportation jusqu'à la consommation et surtout en permettant de détecter les responsabilités en cas de crise sanitaire. La traçabilité permet aussi de gérer plus rapidement les crises et donc de pouvoir retirer rapidement des lots de marchandises potentiellement dangereuses pour la santé des consommateurs. La traçabilité est aussi nécessaire dans le commerce et la concurrence, pour le choix des fournisseurs par les clients et

plus particulièrement par des distributeurs. De plus, le système de traçabilité apporte des précisions sur la composition du produit et sur son parcours technologique. Ces aspects sont primordiaux pour l'innocuité et la qualité des aliments ainsi que sur leur étiquetage pour la mise sur le marché.

La traçabilité permet aussi d'ajouter de la valeur aux produits, de créer de nouveaux services par l'innovation en utilisant la traçabilité comme levier stratégique dans la gestion des biens des services et des personnes (identification, authentification, localisation, sécurisation, services associés).

Les systèmes de traçabilité ne doivent pas être perçus uniquement comme une barrière au commerce mais également comme une possibilité d'améliorer la gestion dans l'ensemble de l'industrie, la position sur le marché et l'avantage compétitif.

L'obligation de traçabilité peut être considérée comme une partie fondamentale du système HACCP (Analyse des dangers-points critiques pour leur maîtrise), puisque le système est sans signification sauf si les données sont enregistrées par rapport à un numéro de lot qui mentionne non seulement le jour et la période de la réception ou de l'envoi mais également l'origine de la matière première utilisée, et sa transformation, laquelle implique une obligation de traçabilité.

Les systèmes de traçabilité recouvrent de nombreux aspects, liés aux systèmes techniques, à la gestion, la réglementation, l'économie et la communication. Dans la pratique, les systèmes employés pour assurer la traçabilité ne sont pas imposés par la réglementation et vont des simples systèmes sur support papier aux solutions totalement automatisées basées sur les Technologies de l'Information.

Actuellement, la traçabilité est appliquée à *quasi* tout le secteur agro-alimentaire. La diversification des circuits, le développement technologique, l'évolution des comportements des consommateurs et la maîtrise des conditions d'hygiène et de sécurité contribuent à instaurer un nouveau mode de gestion des risques alimentaires. La sécurité est abordée de manière globale au sein d'une entreprise, d'une filière et même au niveau international. Elle a conduit les autorités tant nationales que communautaires à mettre en place des réglementations très

strictes en matière de traçabilité. Du point de vue de l'UE (Union Européenne), la traçabilité a pour fonction première le retrait ciblé des produits en cas de nécessité. En outre, elle vise à garantir la protection contre la tromperie et le libre choix du consommateur. Les deux filières les plus strictement réglementées, au niveau de la traçabilité sont celle de la viande bovine et celle des produits OGM. Pour la filière de fruits et légumes, il existe une réglementation moins spécifique, telle que le décret sur l'étiquetage qui mentionne la présence du lot de fabrication sans toutefois définir ce lot. Dans le cas de la filière poisson, une réglementation communautaire a été mise en place à partir du janvier 2002 (Règlement CE N°2065/2001). Elle concerne des dispositions obligatoires en matière d'information des consommateurs sur l'étiquetage des produits de la pêche et de l'aquaculture.

1.7.3. Législation européenne pour la traçabilité

Le Traité de Rome ne comporte que quelques dispositions sur la politique sociale, considérée alors comme un prolongement des mesures économiques. Elle ne concerne pas des dispositions pour les consommateurs. Jusqu'à 1972, pour la première fois le Conseil des ministres de la Communauté Économique Européenne (CEE) a discuté sur la nécessité de protection et d'information des consommateurs. Mais il faudra attendre l'Acte unique européen de 1986, ainsi que le Traité de Maastricht de 1992 pour que la Communauté Européenne (CE) se fixe comme objectif, dans son article 153 (ex-article 129A) le principe suivant « Afin de promouvoir les intérêts des consommateurs et d'assurer un niveau élevé de protection des consommateurs, la Communauté contribue à la protection de la santé, de la sécurité et des intérêts économiques des consommateurs ainsi qu'à la promotion de leur droit à l'information, à l'éducation et à s'organiser afin de préserver leurs intérêts » (Ferrier, 1996).

Le règlement n°178/2002, appliqué au 1er janvier 2005, de l'UE met en avant l'obligation de salubrité générale des produits alimentaires, qui affecte toutes les entreprises alimentaires de l'UE de même que les importations alimentaires. Le règlement oblige légalement les entreprises à garantir « *la traçabilité des denrées alimentaires, des aliments pour animaux, des animaux producteurs de denrées alimentaires et de toute substance devant être incorporée dans une denrée ou un aliment pour animaux à tous les niveaux de la production, de la transformation et de la distribution* ».

L'UE a adopté de nouvelles directives, les règlements CE 852, CE 853 et CE 854 en 2004 pour fournir plus de détail sur la façon de se conformer aux normes relatives à la traçabilité et à la qualité des aliments du règlement n° 178/2002 antérieur. Ces règlements sont entrés en vigueur le 1^{er} janvier 2005.

A ce jour, la réglementation en vigueur dans l'Union Européenne impose la fourniture de certificats sanitaires qui doivent accompagner tous les produits alimentaires importés vers l'UE. (Règlement CE N° 1664/2006). Un modèle de certificat sanitaire est établi pour chaque pays tiers (Thaïlande : 94/325/CE ; Malaisie : 96/608/CE ; Vietnam : 1998/813/CE). Ce document, qui est vérifié par la douane lors de chaque arrivage, comporte 4 grands chapitres : identification des produits, origine des produits, destination des produits et attestation sanitaire.

1.7.4. La traçabilité du poisson et des produits halieutiques

La traçabilité n'est pas un nouveau concept pour le poisson et les produits de la pêche. Le poisson frais est un produit fortement périssable et le système de traçabilité a été utilisé systématiquement dans l'industrie halieutique, en particulier depuis l'introduction des règlements HACCP.

La filière pêche se caractérise par : la nature de ses produits qui sont essentiellement de capture, les quantités pêchées aléatoires, la saisonnalité pour certains espèces, le caractère migratoire pour d'autres, la localisation dans des zones différentes selon l'âge ou la maturité sexuelle pour d'autres encore, le délai variable entre la capture et le débarquement lié à l'éloignement de la zone de pêche (pêche côtière et pêche hauturière) et la courte durée de conservation des produits (Montet, 2004).

Durant ces dernières années, le commerce international des produits piscicoles a dû faire face aux principaux problèmes suivants : l'évolution de mesure de contrôle de la qualité et de la sécurité sanitaire dans les principaux pays importateurs ; l'introduction de nouvelles prescriptions en matière d'étiquetage et de traçabilité ; l'adoption des directives de la FAO (Food and Agriculture Organization) pour l'étiquetage écologique du poisson et des produits de la pêche provenant de capture marine et également par des différents commerciaux entre pays importateurs et pays exportateurs motivés par des accusations de dumping des produits de l'aquaculture et de subventions à la production (FAO/SOFIA 2006).

Depuis le 1^{er} janvier 2002, l'UE (Union Européenne) a publié une loi sur la traçabilité de poissons, qui oblige les producteurs à mentionner sur l'étiquetage du produit : le nom commercial de l'espèce et le nom latin ; l'origine du poisson naturelle ou aquacole ; le pays d'origine du poisson ; issu de la pêche en eau douce naturelle ou d'élevage et l'océan ou la mer d'origine pour les espèces marines naturelles. Le consommateur doit savoir si le poisson est sauvage avec mention de la zone de capture, s'il est issu d'eau douce ou d'eau de mer avec la mention du pays d'origine (FAO/SOFIA 2002).

Dans le cadre du Comité des pêches de la FAO qui s'est déroulé en Espagne en 2006, à la neuvième session, le Sous-comité du commerce du poisson a déclaré son soutien à l'activité de la FAO dans le domaine du commerce du poisson et en particulier pour la fourniture d'une assistance technique et au renforcement des capacités en matière de qualité et de sécurité sanitaire du poisson, y compris l'analyse des risques et la traçabilité. Les participants ont aussi discuté sur la préoccupation des problèmes de sécurité sanitaire ayant ou pouvant avoir un effet sur le commerce international du poisson. Les consommateurs doivent avoir la perception de la sécurité sanitaire du poisson, parmi lesquels les dioxines et les biphényles polychlorés dans le saumon, la farine de poisson et ESB (encéphalopathie spongiforme bovine) et les résidus antibiotiques dans les produits aquacoles (Comité des pêches, 2006).

A la vingt-septième session du Comité des pêches à Rome en 2007, le Comité a reconnu l'importance de la traçabilité pour le commerce du poisson. Outre l'assurance de qualité sanitaire des produits, la traçabilité permet en effet dans certains cas, d'empêcher la pénétration sur les marchés nationaux et internationaux de poissons capturés lors de pêches illicites, non déclarées et non réglementées. Il a également souligné qu'il convenait de mettre au point des mécanismes simples et concrets de traçabilité pour la pêche artisanale. Le Comité a estimé que ces mécanismes devraient être compatibles avec les règles de l'OMC (Comité des pêches, 2007).

Au sein de l'UE, une nouvelle législation relative à l'hygiène des denrées destinées à l'alimentation humaine et animale est entrée en vigueur le 1^{er} janvier 2006. Cette législation fait partie intégrante de la stratégie de l'UE dite « de la ferme à la table » en matière de sécurité des denrées alimentaires. Pour satisfaire les

exigences de cette législation, les techniques de traçage doivent être améliorées en commençant du producteur primaire (aliments pour animaux et antibiotiques thérapeutiques utilisés en aquaculture), jusqu'au traitement postérieur à la récolte, à la transformation et à la distribution (Comité des pêches, 2006).

Aux États-Unis, plusieurs réglementations préconisent des systèmes de traçabilité dans le domaine de la production des produits halieutiques. Le *Public Health Security and Bioterrorisme Preparedness and Reponse Act* de 2002 et les règlements pertinents comportent plusieurs exigences visant à améliorer la traçabilité. Le *Farm Security and Investment Act* des États-Unis de 2002 (*Farm Bill*) exige que les détaillants notifient leurs clients du pays d'origine des produits de la pêche depuis le 30 septembre 2004. Il faut également signaler aux consommateurs si le produit visé est un « produit sauvage » ou un « produit d'élevage ». Cette disposition n'est pas considérée comme une mesure de salubrité des aliments mais comme un renseignement fourni aux consommateurs pour les aider à choisir les aliments qu'ils achètent (Anonyme n°1, 2004).

Dans certaines régions du monde, le poisson est produit par un très grand nombre de petites sociétés de pêches. Il est donc très difficile de fournir aux consommateurs un dimensionnement précis des poissons et une surveillance suffisante dans une telle chaîne d'approvisionnement ou exercent un grand nombre de petits pêcheurs largement dispersés et beaucoup ne savent ni lire ni écrire. Dans d'autres régions, les poissons peuvent transiter par les marchés de gros et les systèmes de traçabilité doivent s'adapter aux pratiques traditionnelles. Les collecteurs de poissons comme on peut le voir au Vietnam en particulier, recueillent des poissons venant de nombreuses petites fermes et il devient impossible à ce niveau de définir formellement l'origine des poissons. Dans ce cas, l'origine se situe au niveau de l'entreprise de transformation et non au niveau du producteur. Les opérateurs en aquaculture font face à des problèmes particuliers avec la traçabilité car la chaîne ne se limite pas au poisson. Celui-ci reste le simple produit intermédiaire de la transformation qui peut être très importante comme dans les plats cuisinés. Le système de traçabilité doit inclure des procédés visant à l'identification des lots séparés des divers produits utilisés par le fermier, tels les aliments à base de farine de poisson, les produits vétérinaires, les alevins ou les œufs, les additifs et autres ingrédients et le stock de reproduction (Anonyme n°2, 2002).

Les différentes techniques commerciales de traçage des poissons et des produits de pisciculture ont été décrites par Håstein *et al.* (2001), on trouve : les marques externes telles que les étiquettes de faible taille accrochées directement dans la chair des poissons de la marque Floy, ou Carlin et les transmetteurs passifs intégrés comme l'injection de marqueurs chimiques à l'aide de substances inorganiques comme le nitrate d'argent ou le nitrate de potassium, les pigments, l'oxytétracycline,...

Ces marqueurs peuvent permettre de distinguer les poissons d'origine naturelle et les poissons d'élevage. Cependant, ces méthodes ne sont utilisées qu'en recherche pour étudier les populations ou identifier les poissons d'aquaculture qui s'échappent vers les rivières. Pour le commerce du poisson, ces méthodes ne peuvent pas être appliquées car il est difficile de marquer chaque poisson de façon individuelle et il est de plus interdit de rajouter des substances chimiques non autorisées aux produits alimentaires. Les poissons pourraient être tracés par un marquage à chaud ou à froid, comme par exemple le marquage par laser. Toutefois, ces type de marquage peuvent créer des blessures et influencer la croissance des poissons (Berge, 1990 ; Hargreaves, 1992), il est par contre possible de penser à ces techniques pour du poisson mort. Le marquage par jet d'encre avec le bleu alcian a été appliqué pour tracer le saumon atlantique. Après six mois de conservation, ce marquage reste encore visible (Herbinger *et al.*, 1990).

La traçabilité génétique grâce à la caractérisation de l'acide désoxyribonucléique se développe assez rapidement pour les élevages de reproducteurs ainsi que pour les populations sauvages. Cette technique présente un degré très élevé de fiabilité pour confirmer ou infirmer l'origine, l'ascendance ou la souche des animaux ou des produits; elle peut également servir de preuve devant les tribunaux (Håstein *et al.*, 2001)

I.8. Détermination de l'origine géographique

I.8.1. Objectif

La détermination de l'origine géographique est considérée comme un élément clef de la traçabilité.

La détermination de l'origine géographique a trois objectifs :

- Créer de la valeur ajoutée autour du produit,
- Crédibiliser la communication,

- Développer de bonnes pratiques professionnelles entre les acteurs de la chaîne (Debord, 2003).

Un des meilleurs exemples de la mise en valeur de l'origine en alimentaire est le système des appellations européen (IGP, AOP) qui permet de mettre en valeur la relation terroir - origine géographique.

Les consommateurs sont demandeurs d'information sur l'origine des produits qu'ils consomment. Afin de garantir leur confiance, la détermination de l'origine géographique doit permettre de protéger des produits dont l'origine est déclarée, les systèmes de production labellisés et de prévenir les fraudes par rapport au cahier des charges des producteurs, des transformateurs et des distributeurs.

1.8.2. Méthodes analytiques permettant la détermination de l'origine géographique

Il faut imaginer des méthodes analytiques qui prennent en compte des éléments de l'environnement de l'aliment que l'on pourra retrouver dans l'aliment final.

1.8.2.1. Eléments minéraux et oligoéléments

Les éléments minéraux et les oligoéléments sont considérés comme un groupe de constituants des aliments prometteurs pour la détermination de l'origine géographique car on peut supposer qu'ils proviennent de l'environnement local. Les aliments peuvent ainsi être caractérisés par le profil des oligoéléments naturels provenant des sols aussi bien que par le profil spécifique des minéraux apportés par l'eau, l'air ou le régime alimentaire (Pfeifer *et al.*, 2000).

La quantité et la composition des éléments dans le sol est une des caractéristique des régions. Par exemple, la concentration de Se dans le sol américain est bien supérieure à celle trouvée en Europe. La spectroscopie d'absorption atomique a été appliquée pour déterminer la quantité de Se dans la viande de bœuf. Franke *et al.* (2005) ont ainsi montré que la viande de bœuf de l'Amérique du nord contient approximativement deux fois plus de Se que celle du Suisse.

L'origine géographique du thé peut être déterminée par des oligoéléments comme Cd, Co, Cr, Cs, Hg, Li, Rb,... mesurée par ICP-AES (Inductively coupled

plasma atomic emission spectrometer). Une distinction entre le thé africain et le thé chinois, ainsi que d'autres thés asiatiques a pu être déterminée (Marcos *et al.*, 1998 ; Fernández-Cáceres *et al.*, 2001). L'ICP-AES et l'ICP-MS (Inductively coupled plasma mass spectrometry) ont été employés pour mesurer 22 oligoéléments dans des échantillons de jus d'orange australiens et brésiliens (Simpkins *et al.*, 2000). Ariyama *et al.* (2004) ont discriminé, par l'analyse des oligoéléments, l'origine géographique d'oignons commercialisés au Japon ou en Chine. Smith (2005) a proposé une méthode pour déterminer le pays d'origine de l'ail en comparant son profil en oligoéléments à une base de données. La douane américaine peut ainsi retrouver les pays exportateurs d'ail pour appliquer la loi anti-dumping. Les différences significatives dans les compositions métalliques ont permis de différencier l'origine géographique du vin (Fras *et al.*, 2003).

Les effets artificiels, tels que la pollution industrielle, l'exploitation d'une mine ou des désastres comme Tchernobyl ont des effets sur la composition minérale et isotopique des sols et de l'eau qui pourraient également être utilisés pour déterminer l'origine géographique des aliments. Par exemple, la pollution par le mercure dans la province de Guizhou en Chine a eu des effets sur la concentration en mercure dans l'eau, le sol et les poissons, avec une tendance de réduction liée à l'augmentation de la distance de la source de pollution (Horvat *et al.*, 2003). Dans les régions fortement contaminées par les retombées radioactives de Tchernobyl en 1986 tels que le Nord de la Suède, il y a toujours un transfert considérable de ^{137}Cs du sol par l'intermédiaire de l'herbe aux animaux comme les agneaux (Andersson *et al.*, 2001). Il est également mesuré une contamination élevée de la viande de renne (Ahman *et al.*, 2001).

Les études bibliographiques ont démontré un certain potentiel de l'utilisation des oligoéléments pour déterminer l'origine géographique des aliments. Quelques éléments présentent un intérêt particulier pour discriminer les produits à un niveau régional (exemple du ^{137}Cs), d'autres pour la différenciation d'origine sur différents continents (exemple du Se). La composition des oligoéléments des aliments est cependant influencée par divers facteurs. Les résultats deviennent par exemple moins précis lors des migrations animales. Une restriction sérieuse de l'utilisation de certains oligoéléments pour la détermination de l'origine géographique des animaux est qu'ils sont souvent nourris avec des suppléments alimentaires enrichis avec des

éléments essentiels qui proviennent souvent d'une seule compagnie (Knowles *et al.*, 2006).

Les éléments qui sont spécifiques pour l'eau et l'air locaux sont les plus prometteurs pour la vérification de l'origine géographique des aliments. L'analyse des oligoéléments peut être très utile pour faire une cross-validation en complément d'autres valeurs analytiques.

1.8.2.2. Les isotopes stables

Les isotopes stables les plus fréquemment étudiés (^2H , ^{13}C , ^{18}O) sont présents en faible quantité dans tous les organismes vivants. Cette abondance naturelle varie avec l'origine géographique de chaque espèce et avec la physiologie de l'organisme producteur (Smith et Epstein, 1970). Les rapports des isotopes stables (proportion de l'isotope rare en comparaison avec son occurrence naturelle) fournissent un outil analytique intéressant pour confirmer l'origine des aliments car il y a parfois des profils région-spécifiques liés aux rapports isotopiques environnementaux (sol, eau). Comme les oligoéléments, les isotopes sont retrouvés dans le corps des animaux.

Les rapports des isotopes stables de l'hydrogène et de l'oxygène sont fortement dépendants de la latitude. L'eau météorique qui a traversé le cycle météorologique de l'évaporation, de la condensation et de la précipitation rentre dans la composition des eaux souterraines leur conférant des variations géographiques d'isotopes (Yuntseover et Gat, 1981). Les études précédentes ont clairement prouvé que la teneur en ^{18}O et en ^2H de l'eau, consommée par des animaux, montrent une corrélation forte avec ^{18}O et ^2H des composés organiques produits par les animaux tels que le lait, le beurre et le fromage (Manca *et al.*, 2001). Cette corrélation est également trouvée dans les tissus animaux et a été exploitée par des écologistes pour déterminer les modèles migrateurs des insectes (Hobson, 1999) et des oiseaux (Wassenaar et Hobson, 2001).

Hegerding *et al.* (2002) ont étudié si le rapport $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ des eaux souterraines locales, mesuré par SMRI (spectrophotométrie de masse du rapport isotopique), a été préservés dans l'eau des tissus des cheptels bovins provenant d'Allemagne, du Royaume-Uni et d'Argentine. La mesure des différences significatives du rapport $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ de l'eau des tissus du bétail allemand et du bétail argentin a permis une classification de leur origine géographique. Cependant, la variation du rapport de

$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ n'a pas fourni une résolution suffisante pour distinguer les échantillons anglais de ceux d'Allemagne ou d'Argentine. Pareillement, les analyses des échantillons de viande de bœuf indiquent qu'il est possible de tracer la région de production (Europe et Amérique) en employant les rapports isotopiques des D/H et $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (Borner et Förstel, 2003 ; Schmidt *et al.*, 2005). Une différenciation géographique locale peut être relevée par analyse des rapports isotopiques des $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ et $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ (Boner et Förstel, 2003). La détermination de l'origine géographique de la viande de volailles et de la viande séchée de bœuf a été effectuée par la mesure du rapport isotopique $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ et $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ par SMRI (Franke *et al.*, 2008). Différents échantillons ont été prélevés dans le filet de poitrine de poulet (Suisse, France, Allemagne, Hongrie, Brésil, Thaïlande) et de viande séchée de bœuf (élaboré en Suisse, en Autriche, en Australie, aux Etats-Unis, au Canada avec de la viande crue de diverses origines). Le rapport isotopique de $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ a permis une différenciation sans équivoque entre les différents pays à la fois sur la viande de poulet et sur la viande crue utilisée pour fabriquer la viande séchée de bœuf. Par contre, le rapport de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ n'a pas donné d'indications suffisantes pour la détermination de l'origine géographique des échantillons.

Deponge *et al.* (2001) ont utilisé la SMRI pour déterminer les enrichissements isotopiques en ^{18}O et ^2H du lait sur deux sites différents par leur situation géographique et leur altitude : Rennes pour la plaine (altitude 200 m) et Marcenat pour la montagne (altitude 1100 m). Les triglycérides extraits de la crème étaient analysés par RMN (Résonance magnétique nucléaire) du ^{13}C . La composition en acides gras dépend donc plus du régime alimentaire tandis que les enrichissements isotopiques sont plus dépendants de la situation géographique. Une analyse discriminante montre que la RMN ^{13}C et la SMRI sont 2 méthodes d'analyses qui permettent de caractériser le lait selon l'origine géographique et le mode d'alimentation. Sur un même site, 100% des laits sont bien classés en fonction du régime alimentaire et pour une même alimentation en fonction du site. L'analyse multiélément isotopique stable pour C, N, O, S du beurre et l'évaluation des résultats par comparaison avec des données issues d'échantillons authentiques certifiées pourrait être un outil à forte potentialité pour résoudre le problème de l'origine géographique du beurre (Rossmann *et al.*, 2000). Le rapport des isotopes stables ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{34}\text{S}$ de la caséine et $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{18}\text{O}$ du glycérol) de fromages français, italien et espagnol mesuré par SMRI a montré une bonne discrimination entre les

fromages européens (Camin *et al.*, 2004). Le rapport des isotopes de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, D/H et $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ a été utilisé pour distinguer le fromage de Peretta traditionnel fabriqué à partir du lait produit en Sardaigne (Italie) et des fromages fabriqués avec la matière première importée d'autres pays (Manca *et al.*, 2006). Le rapport isotopique du $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ dans 18 types de fromage Emmental provenant de différentes régions (Alpes, Bretagne, Finlande, Canada, Australie) a été également mesuré par MC-ICP-MS (Fortunato *et al.*, 2004). Ce rapport était conforme à la géologie locale des secteurs de production.

Le rapport isotopique du $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ des échantillons de riz chinois et vietnamiens était légèrement plus élevé que celui des échantillons japonais (Kawasaki *et al.*, 2002) alors que le riz australien a obtenu le rapport $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ le plus élevé parmi les échantillons de riz examinés. En revanche, le rapport du riz californien était inférieur à celui des échantillons japonais. La variation du rapport du $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ du riz a clairement démontré que ce rapport pourrait fournir des informations importantes sur la provenance du riz.

La relation entre le contenu isotopique et la latitude a été confirmée pour de la semoule de froment en utilisant le rapport isotopique du carbone, de l'oxygène et de l'azote sur des échantillons italiens, canadiens, turcs et australiens (Brescia *et al.*, 2002).

Un grand nombre d'études utilisant l'analyse multi-isotopique a été conduit sur la provenance du vin. Ceci est dû à la valeur élevée du vin en comparaison à d'autres produits agricoles et au fait qu'une production de haute qualité à partir des régions particulières a été longtemps identifiée par des AOC (Appellation d'Origine Contrôlée) et autres législations européennes. La variation du rapport isotopique $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ selon la région de production a été montrée par Breas *et al.* (1994) et cette mesure a été incluse dans la base de données officielle européenne du vin depuis 1996 (Règlement CE N° 2729/2000).

Barbaste *et al.* (2002) ont pu différencier des vins d'origines géographiques différentes en analysant le rapport $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ et Coetzee et Vanhaecke (2005) ont fait de même sur des vins rouges d'Afrique du Sud, d'Italie et de France avec le rapport du $^{11}\text{B}/^{10}\text{B}$.

Les rapports isotopiques de H et de O, qui dépendent de la quantité d'eau potable consommée, ne peuvent pas être facilement falsifiés ou masqués en alimentant les animaux avec des ingrédients extérieurs à leur région. Par contre, les

rapports isotopiques des C et de N sont souvent caractéristiques des systèmes de production et du niveau d'alimentation (Rossmann *et al.*, 2000). Le rapport isotopique du $^{86}\text{Sr}/^{87}\text{Sr}$ est typique du sol de certaines régions et son rapport local dépend des particularités géologiques (type, formation et âge géologique du terrain) (Pfeifer *et al.*, 2000).

Cette approche a cependant quelques contraintes importantes. Les conclusions doivent tenir compte des nombreux facteurs environnementaux (par exemple le climat, l'altitude, la distance de l'océan) qui peuvent influencer fortement les rapports isotopiques des aliments. Un autre inconvénient est dû à la préparation longue et coûteuse des échantillons ainsi que le coût élevé de l'équipement analytique.

1.8.2.3. Composition chimique globale ou analyse des constituants majeurs

Cette approche est moins spécifique mais beaucoup plus facile à utiliser. Actuellement, de nombreuses méthodes basées sur l'analyse globale, telles que la SPIR (Spectroscopie proche infrarouge), la RMN (Résonance magnétique nucléaire) permettent une détermination rapide des compositions chimiques contrairement aux méthodes traditionnelles (Fontaine *et al.*, 2001). Ces techniques sont prometteuses pour l'authentification des produits alimentaires en raison de la possibilité d'analyser de façon globale la composition des aliments et de donner un spectre qui pourrait être relié à l'origine des produits.

Renou *et al.* (2004) ont étudié le lait de vaches élevées dans deux endroits distincts, qui diffèrent par leurs situations géographique et leurs altitudes (montagne et plaine). Ils ont utilisé la RMN pour déterminer la composition en acides gras polyinsaturés (PUFA), acides gras monoinsaturés (MUFA) et acide gras saturés (SFA) dans la fraction lipidique du lait. Le pourcentage de PUFA était significativement plus grand dans le lait de montagne que dans celui de la plaine, quand le MUFA et le SFA n'ont pas différencié de manière significative entre les deux endroits. Il y a donc un effet géographique marqué sur les acides gras polyinsaturés.

En France, 276 vins de même cépage, le Gamay, ont été collectés durant 3 années (1998, 1999, 2000) et leurs extraits secs ont été analysés par spectroscopie moyen infrarouge afin d'authentifier les régions d'origine, Gaillac, Beaujolais ou Touraine (Picque *et al.*, 2002). Les analyses ont été assez puissantes pour classer les vins de même cépage de différentes régions de France.

La technique de la pyrolyse de point de curie couplée à la spectrométrie de masse (Cp-PyMS) a été étudiée pour discriminer des huitres élevées dans différents sites de productions (Cardinal *et al.*, 2000). Cette technique fournit une « empreinte » globale de la matrice des carbohydrates, lipides et protéines du produit alimentaire. 89% des échantillons ont pu être classifiés avec succès, indépendamment de la saison.

Bien que les effets clairs des facteurs de production sur la composition chimique globale des aliments soient connus, leur attribution exclusive à l'origine géographique semble être difficile. Il sera certainement nécessaire de faire une cross-validation avec d'autres analyses.

1.8.2.4. Composés volatils

Les substances volatiles des aliments peuvent être spécifiques de l'origine géographique. L'« empreinte olfactive » des échantillons est obtenue par analyse globale des substances organiques de l'espace de tête de l'échantillon, au moyen d'une technique reconnue : la spectrométrie de masse. Cette technique utilise un « nez électronique » qui est composé de capteurs qui fixent les molécules aromatiques. Il est employé dans beaucoup de domaines pour le contrôle de la qualité, par exemple l'acceptation ou le rejet des matières premières telles que le café (Gretsch *et al.*, 1998), le thé (Dutta *et al.* 2003), l'appréciation de la maturité des fruits (Supriyadi *et al.*, 2004). D'autres applications de discrimination de jus d'orange sont aussi décrites (Goodner *et al.*, 2001).

Le projet européen « Fishnose » (Anonyme n°3, 2004) propose le développement d'un nez électronique pour la détermination de la qualité du poisson. En caractérisant un produit par son « odeur », le nez électronique peut aider à préciser sa nature, sa qualité et son origine également. Cette technique est reproductible, sélective, sensible et rapide. Cependant, l'équipement est coûteux et il peut être nécessaire de créer une importante banque de données.

1.8.2.5. Détermination génétique des animaux

Les techniques de génétique moléculaire donnent des perspectives d'identification et de traçabilité des individus et de leurs produits sous forme d'« empreintes génétiques » (« DNA fingerprinting »). En effet, d'une part, toutes les cellules d'un animal possèdent la même information génétique et d'autre part, celle-ci

est propre à l'individu. L'analyse des microsatellites de l'ADN permet d'obtenir une empreinte génétique fournissant une information *quasi* infaillible quant à l'identité et la parenté des individus. Les microsatellites sont des séquences courtes répétées en tandem et caractérisées par un grand nombre d'allèles (une dizaine) qui diffèrent par le nombre des répétitions. Cette information peut être obtenue à partir de très peu de matériel biologique. Cette méthode s'avère être à l'heure actuelle une méthode fiable, pratique, de coût raisonnable pour identifier, certifier ou authentifier l'origine des produits alimentaires transformés ou non (China *et al.*, 2004).

Jusqu'à présent, l'identification biologique des individus était basée sur des caractères non visibles de l'expression de gènes identifiables (typage des groupes sanguins, analyse du profil électrophorétique de certaines protéines ou enzymes) dont la transmission au cours des générations peut être facilement analysée. Néanmoins, ces marqueurs phénotypiques sont souvent peu polymorphes et, dans les populations dont le taux de consanguinité est plus ou moins élevé, ils peuvent se montrer inadéquats pour les tests d'identité ou de parenté. Par ailleurs, ils ne peuvent être mis en évidence qu'à partir de tissus dans lesquels ils sont exprimés, et généralement à partir d'échantillons fraîchement récoltés.

En raison de la dégénérescence du code génétique (à un acide aminé correspondent plusieurs codons), le polymorphisme présent au niveau de l'ADN constituant les gènes est toujours plus élevé que celui observable au niveau du produit des gènes (les protéines). C'est pourquoi la méthode d'empreintes génétiques est basée sur la mise en évidence des polymorphismes au niveau de l'ADN. Cet ADN, source des marqueurs génotypiques, constitue donc le meilleur matériel d'étude pour différencier les êtres vivants (Portetelle *et al.*, 2000).

Actuellement, on dispose pour la plupart des espèces animales domestiques d'informations de plus en plus complètes sur les microsatellites (« simple sequence repeats » ou SSR), leur composition (souvent la répétition des dinucléotides (dCdA)_n/(dGdT)_n), leur disposition tout au long du génome, leur nombre, et les séquences qui leur sont adjacentes dans le génome, à l'endroit de leur insertion. Ces séquences adjacentes aux répétitions en tandem peuvent être utilisées pour synthétiser des oligonucléotides qui leur sont complémentaires et qui serviront d'amorce pour l'amplification du microsatellite par la PCR (Polymerase Chain

Reaction). Dès son arrivée au laboratoire, l'ADN de l'échantillon à expertiser et de l'échantillon de référence est extrait par des techniques éprouvées. Les microsatellites recherchés sont amplifiés par PCR avant d'être séparés en fonction de leur taille par une technique électrophorétique. La longueur de ces microsatellites est spécifique à chaque individu et l'ensemble des microsatellites analysés permet alors d'établir un profil unique, une empreinte génétique pour chaque individu (Vos *et al.*, 1995).

Loftus *et al.* (1994) ont étudié l'origine et le statut taxonomique des bétails domestiques. Les races de zébus et de taureaux africains ont montré une divergence des séquences plus élevée que celle des races indiennes mais plus basse que celle des races européennes. La distribution géographique et la fréquence des haplotypes de chromosome de *Bos taurus* et *Bos indicus* de bétail créole en Amérique du Sud ont été étudiées en utilisant des techniques de cytogénétique et de génétique moléculaire (Giovambattista *et al.*, 2000). La distribution géographique de ce polymorphisme suggère un modèle d'introgression du zébu en Amérique du Sud. Les fréquences les plus élevées sont trouvées dans la population brésilienne dans la partie orientale du continent, alors que ce polymorphisme est absent dans les races uruguayennes et argentines au Sud du continent. Les races boliviennes, au centre du continent, montrent des valeurs intermédiaires. Ce gradient de l'introgression du zébu a pu être expliqué par des événements historiques et des facteurs environnementaux. Dans une autre étude, en réponse à la crise de confiance des consommateurs et à leur régulière désaffection pour la viande bovine, dans le cadre des efforts développés actuellement pour améliorer et sécuriser la traçabilité des bovins, Sancristobal-Gaudy (2000) et son équipe sont parvenus à proposer et à valider une méthode d'identification individuelle des viandes bovines à l'aide de marqueurs moléculaires de type microsatellite. Plusieurs prélèvements ont été effectués sur des jeunes bovins de domaines expérimentaux INRA, *in vivo* et *post mortem*. La détermination des génotypes aux 11 loci, puis la comparaison deux à deux de ces génotypes à l'aide d'une méthode statistique adéquate prenant en compte les particularités des microsatellites permet de recommander d'une part que le typage soit réalisé sur au moins huit marqueurs pour assurer une traçabilité parfaite, et d'autre part que des précautions indispensables soient prises concernant la qualité des prélèvements et la gestion des échantillons lors d'une mise en œuvre à

grande échelle. Cette approche devrait permettre de sécuriser et de renforcer la nouvelle réglementation sur l'étiquetage des viandes de l'étable à l'étal.

Chez le porc, China *et al.*, (2004) ont développé un système de traçabilité génétique basé sur le séquençage de régions riches en SNPs (simple nucléotide polymorphismes). Ils montrent qu'il est possible d'obtenir le génotype spécifique d'un individu en séquençant deux régions riches en SNPs. De plus, la possibilité d'obtenir un amplicon hybride regroupant les deux séquences permet d'obtenir le génotype par séquençage d'un seul produit de PCR. Cette approche pourrait être utile dans le contexte de traçabilité car il est possible de comparer les génotypes obtenus à partir de tissus différents du même animal.

En aquaculture, l'application de la génomique a été d'une grande utilité pour relier le lien de parenté et l'évaluation de la variabilité. Actuellement, il y a de plus en plus d'applications des marqueurs ADN pour assurer la traçabilité du poisson. Cette approche devient attrayante pour un certain nombre de raisons. Les marqueurs ADN peuvent être génotypés en prenant un échantillon du poisson à n'importe quelle étape de la chaîne de production. Une petite quantité d'échantillon est suffisante pour l'analyse de l'ADN, ce qui permet de travailler sur des poissons vivants. Deux types de marqueurs ADN ont été suggérés pour la traçabilité : les microsatellites et les SNPs. Un nombre considérable des loci des microsatellites sont maintenant disponibles pour le tilapia, la truite arc-en-ciel et le saumon atlantique (Kocher *et al.* 1988 ; Sakamoto *et al.*, 2000 ; Gilbey *et al.*, 2004) et ont été ou sont développés pour beaucoup d'autres espèces de poisson. Un grand nombre (>1000) de SNPs ont été décrits pour les salmonidés (Smith *et al.*, 2003) et le poisson-chat (He *et al.*, 2003). Les marqueurs microsatellites sont fortement instructifs car on travaille avec beaucoup d'allèles à chaque locus, alors que les SNPs ont typiquement 2 allèles pour chaque locus (Glaubitz *et al.*, 2003).

1.8.2.6. Profil microbiologique

Les méthodes qui emploient l'analyse globale de la flore microbienne sont basées sur le principe que l'environnement a un effet sur l'écologie microbienne de l'aliment et que cette écologie serait retrouvée conservée dans l'aliment. Les populations bactériennes pourraient constituer un « marqueur microbiologique » permettant d'identifier l'origine de tous types de produits alimentaires en utilisant la

diversité ou la communauté des bactéries présentes dans ces produits. Généralement, le but de l'analyse microbiologique des produits alimentaires est d'évaluer la présence possible de bactéries ou d'organismes pouvant avoir des conséquences sur la santé du consommateur et de donner une idée de la qualité hygiénique du poisson en relation avec l'application des bonnes pratiques de fabrication comme le respect de la chaîne du froid, l'hygiène des personnels et des équipements au cours de la manutention et des procédés de fabrication (Huss, 1995b). Pour établir la traçabilité des produits alimentaires, les analyses microbiologiques à mettre en œuvre doivent permettre de dresser un inventaire aussi fidèle que possible des microorganismes présents sur les produits pour relier leur relative composition à une identification d'origine. La question n'est pas de mesurer le niveau des populations bactériennes mais plutôt d'en connaître l'identité aussi finement que possible.

1.8.2.7. Analyse de la résistance aux antibiotiques

L'utilisation massive des antibiotiques en aquaculture intensive cause une modification importante de la diversité bactérienne des poissons et de l'environnement. Les analyses effectuées sur des poissons élevés au Vietnam et en Thaïlande par Sarter *et al.* (2007) ont prouvé que les deux sites représentent des réservoirs potentiels pour la résistance aux antibiotiques. Les profils de résistances et multi-résistances bactériennes pourraient être employés comme marqueurs pour l'élevage intensif du poisson mais cette conclusion doit être confirmée par des analyses à grande échelle dans les deux pays pour les secteurs distincts de production.

I.9. Méthodes d'analyse de la biodiversité microbienne

1.9.1. Méthodes traditionnelles

Les méthodes classiques de microbiologie nécessitent le plus souvent de disposer de souches pures vivantes et cultivables. Les différentes souches microbiennes sont isolées et purifiées sur des milieux de culture plus ou moins sélectifs dans des conditions d'oxygénation, de temps et de température, ou des additifs qui peuvent parfois limiter la croissance de certaines souches au détriment des autres. Pour des populations microbiennes assez homogènes qui ne comportent pas trop individus voire d'espèces ou de genre différents, ces méthodes donnent de

bons résultats. Cependant, quand la diversité des flores augmente, il devient difficile d'isoler et de purifier tous les microorganismes présents dans un échantillon. Cette difficulté est d'autant plus importante que la part des souches anaérobies strictes est plus grande. Il n'existe pas de milieux et de conditions de culture universels permettant d'isoler la majorité des souches viables cultivables d'un échantillon.

Pour l'identification des microorganismes, les critères utilisés peuvent être morphologiques (macroscopique ou microscopique), biochimiques, sérologiques et lysotypiques en fonction de la finesse de l'identification recherchée.

Ces techniques d'analyse de la diversité microbiologique présentent l'inconvénient de ne donner qu'une vue restreinte ou une approximation grossière de la diversité naturelle. Ces problèmes sont connus depuis longtemps et ont été décrits sous le terme de « la grande anomalie du comptage sur boîte » (Stanley et Konopka, 1985 ; Brock, 1987). Selon ces auteurs, entre 0,001 et 15% des bactéries présentes dans un échantillon sont cultivables à l'aide des techniques classiques.

Tableau I.9. : Cultivabilité déterminée comme le pourcentage des bactéries cultivables par rapport aux cellules totales déterminées par comptage direct (D'après Amann *et al.*, 1995).

Habitat	Cultivabilité (%) ^a
Eau de mer	0,001 – 1
Eau douce	0,25
Lac mésotrophique	0,1 – 1
Eau d'estuaires non pollués	0,1 – 3
Boues actives	1 – 15
Sédiments	0,25
Sol	0,3

Ce décalage est à attribuer à différentes causes (Amann *et al.*, 1995 ; Ward *et al.*, 1998) :

- Le milieu de culture choisi ne peut être universel et l'ensemble des conditions environnementales ne peuvent être reproduites sur un seul et même milieu de culture en particulier pour l'environnement à forts gradients physico-chimiques.
- Certaines cellules hors de leur environnement peuvent entrer dans un état viable mais non cultivable. Cet état cellulaire correspond à une adaptation aux

conditions de stress, notamment nutritionnel. Il s'accompagne de modifications physiologiques et structurales dont le rétablissement n'est pas simplement possible sur le milieu synthétique. Cet état peut être maintenu de plusieurs jours à plusieurs années.

- Des populations inférieures numériquement peuvent supplanter des populations majoritaires moins adaptées au milieu de culture.
- Des populations cultivées en liquide peuvent ne pas se développer sur milieu solide.
- La quantité d'inoculum choisie pour l'enrichissement influence le type de cellules enrichies.
- Des microorganismes différents ayant des conditions de croissance similaires seront difficilement distinguables.
- Certaines cellules sont impossibles à obtenir en culture pure comme c'est le cas des microorganismes symbiotes et syntrophes.

C'est pour ces raisons que des méthodes appelées de culture indépendante ont été développées afin d'améliorer les connaissances sur la biodiversité des populations microbiennes complexes.

1.9.2. Méthode de culture-indépendante

Durant la dernière décennie, l'analyse de la composition de la communauté microbienne a évolué considérablement. Des approches de culture-indépendante ont été développées grâce aux progrès en biologie moléculaire. Les méthodes moléculaires se caractérisent par leur rapidité et leur fiabilité. Ces techniques peuvent fournir un profil représentant la diversité génétique d'une communauté microbienne d'un environnement spécifique. L'identification bactérienne basée sur le séquençage des gènes codant pour l'ARN 16S ribosomiaux est devenue un outil très performant pour étudier les communautés bactériennes dans les échantillons environnementaux (Giovannoni *et al.*, 1990 ; Muyzer *et al.*, 1993 ; Ludwig et Schleifer, 1999).

Dans le chapitre suivant, je me propose de décrire ces techniques après avoir présenté les molécules analysées (les ARN ribosomiaux).

I.10. Les acides nucléiques et les techniques de biologie moléculaire en écologie microbienne

I.10.1. Le développement des techniques moléculaires

L'émergence des techniques moléculaires en écologie microbienne est liée au développement de la phylogénie moléculaire à la fin des années soixante (Zuckerland et Pauling, 1965). A la fin des années soixante-dix, l'ARN ribosomique a été choisi comme marqueur évolutif (Woese et Fow, 1977). Les premières études d'écologie microbienne par biologie moléculaire proviennent de l'équipe de Pace qui utilise les résultats de Woese pour accéder à la diversité d'échantillons environnementaux (Pace *et al*, 1986). Ils ont comparé les séquences des ARNr pour établir les liens phylogénétiques entre les espèces d'un écosystème bactérien.

I.10.2. Etude des ARN ribosomiques (ARNr)

En 1968, Kimura a émis le concept d'horloge « évolutionnaire » : la vitesse de l'évolution est constante, les mutations qui surviennent dans le génome n'ont pas nécessairement de conséquences phénotypiques, mais elles sont étroitement corrélées avec le temps. Le taux d'accumulation des mutations est dicté par l'intensité de la pression de sélection et il est du même ordre de grandeur dans des domaines homologues du génome (région soumise à la même pression de sélection). Ainsi les gènes à mutation rapides vont pouvoir refléter des événements évolutifs récents alors que les gènes très conservés seront les témoins d'un passé très éloigné. Dans ces conditions, il est possible de construire un arbre phylogénique en utilisant des méthodes mathématiques et en respectant quelques règles.

Le principe de base consiste à comparer des gènes homologues c'est-à-dire descendant d'un ancêtre commun et ayant conservé une fonction identique au cours du temps. Le choix des séquences à comparer a posé un problème car il était difficile de trouver une molécule qui soit présente et homologue chez tous les organismes et qui présente des niveaux successifs d'information. En effet, pour comparer des organismes très éloignés, il faut utiliser des séquences qui restent sensiblement conservées durant des centaines de millions d'années, tandis que la comparaison d'organismes proches requiert l'étude de séquences où des mutations seront accumulées en quelques millions d'années.

Les ARN ribosomiques (ARNr) sont formés de sous unités pouvant se grouper en polysomes. Ces éléments sont caractérisés par leur constante de sédimentation

exprimée en Svedberg (S). Chez les procaryotes, les ARNr s'associent à des protéines pour former les ribosomes qui sont constitués d'une sous-unité 30S et d'une sous-unité 50S. La sous-unité 30S contient de l'ARNr 16S et la sous-unité 50S contient de l'ARNr 5S et de l'ARNr 23S. L'ARNr 5S est formé d'environ 120 nucléotides, l'ARNr 16S est formé d'environ 1540 nucléotides et l'ARNr 23S comprend environ 2900 nucléotides (Moore, 1998). Dans le ribosome, les molécules d'ARNr, qui sont repliées en une structure secondaire, peuvent être représentées à partir des études comparatives des séquences primaires (Noller et Woese, 1981). Une modification de la séquence primaire de l'ARNr va influencer directement sa structure secondaire. Pour maintenir la fonctionnalité de la molécule, la structure secondaire de l'ARNr doit être conservée dans l'ensemble du monde vivant par le biais de mutations compensatoires (Hancock *et al.*, 1988). Chez une bactérie, les gènes qui codent pour les ARNr (ADNr) sont organisés en opéron dont la structure est semblable. Trois gènes, séparés par un espace, codent pour les ARNr 16S (gène *rrs*), les ARNr 23s (gène *rrl*) et pour les ARNr 5S (gène *rrf*). Ces opérons existent en un ou plusieurs exemplaires sur le chromosome. Le nombre de copies est corrélé à la taille du génome et à la vitesse de croissance des bactéries.

I.10.3. Le choix de l'ARNr 16S

Le choix de la petite sous-unité de l'ARNr (16S chez les Procaryotes et 18S chez les Eucaryotes) peut être expliqué par plusieurs raisons (Pace *et al.*, 1985 ; Ludwig et Schleifer, 1994 ; Ludwig *et al.*, 1998) :

- Sa présence est universelle et il y accomplit le même rôle chez tous les organismes.
- Il a une structure bien conservée car toutes modifications pourraient avoir des conséquences importantes sur les synthèses protéiques.
- Sa séquence est une alternance de domaines dont les vitesses d'évolution varient, permettant de comparer des espèces très proches sur des domaines hypervariables et des espèces très éloignées sur des domaines très conservés.
- Il est relativement facile à isoler en raison de son abondance dans les cellules.
- Sa séquence est facilement obtenue par des méthodes standards d'extraction et de séquençage.

- Il est préféré au 5S et 23S en raison de sa taille moyenne et de sa structure secondaire moins marquée. Sa séquence est suffisamment longue pour réaliser des comparaisons statistiquement cohérentes.

Actuellement, le gène codant pour l'ARNr 16S (ADNr 16S) est un des marqueurs d'espèce le plus utilisé. Il est en effet possible de définir des amorces universelles pour son amplification, et la comparaison de sa séquence avec des banques de données de référence permet de déterminer l'espèce (Stackebrandt et Goebel, 1994).

1.10.4. Les techniques moléculaires dites d'« empreinte génétique »

Ces techniques permettent de comparer plus facilement des échantillons et d'évaluer rapidement la diversité microbienne d'un écosystème. La détection des séquences de l'ADNr 16S est une empreinte de la présence des microorganismes. Elle ne renseigne pas sur la viabilité des cellules ni sur leur activité métabolique. L'ADN de cellules mortes peut persister temporairement dans l'environnement et de nombreuses cellules peuvent se trouver dans un état de dormance. Le contenu en ARNr des cellules d'une population donnée est corrélé au taux de croissance de ces cellules et réagit rapidement aux variations des conditions environnementales (Ward *et al.*, 1990). Cependant, la sensibilité des molécules d'ARNr à la dégradation par les RNases rend l'isolement et la manipulation des molécules d'ARN plus délicats que pour les molécules d'ADN (Von Wintzingerode *et al.*, 1997).

Plusieurs techniques d'analyses de fragments d'ADN sont utilisées. Toutes ces techniques sont basées sur une amplification par PCR de l'ADN de l'écosystème. Le mélange de fragments de produit de PCR est ensuite analysé par diverses techniques d'électrophorèse soit par les méthodes basées sur l'analyse de la taille des fragments (RAPD, ARDRA, RFLP, T-RFLP), soit par les méthodes basées sur la séquence nucléotidique des fragments (SSCP, TGGE/DGGE).

La RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) est une technique d'analyse du génome entier qui utilise plusieurs amorces courtes de séquences définies arbitrairement. Ces amorces s'hybrident aléatoirement en de multiples sites d'une matrice d'ADN (Wikström *et al.*, 1999). Les amorces sont choisies pour amplifier le plus grand nombre de fragments dont la taille est distribuée de façon

homogène entre 50 et 1000 nucléotides. L'analyse par électrophorèse des fragments amplifiés donnera un profil particulier, caractéristique de l'ADN de départ. Un intérêt de cette technique est qu'elle ne nécessite pas de connaissance préalable de l'ADN cible. Cependant, cette méthode ne permet pas d'obtenir une banque d'ADN d'un organisme (Williams *et al.*, 1990), c'est à dire qu'elle ne permet pas de trouver avec précision l'identité d'un microorganisme.

La technique d'ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) est une technique basée sur la digestion enzymatique des ADNr amplifiés par certaines enzymes de restriction. L'ARDRA a été employée pour l'analyse des populations bactériennes de différents environnements (Moyer *et al.*, 1994 ; Martínez-Murcia *et al.*, 1995). Bien que l'ARDRA fournisse peu ou pas d'informations sur le type de micro-organismes actuels dans l'échantillon, elle peut être employée pour une évaluation rapide des changements génotypes de la communauté avec le temps, ou comparer les communautés à différentes conditions environnementales.

La technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) repose sur la digestion d'un ADN cible par une ou plusieurs enzymes de restriction spécifiques des sites de restriction portés par l'ADN. Après électrophorèse, les fragments séparés sont hybridés avec un ADN sonde, provenant souvent de banques d'ADN génomique ou complémentaire. Cette technique donne accès à un nombre très élevé de marqueurs distribués le long du génome. Cette technique permet de mettre en évidence les particularités d'un individu ainsi que de montrer les relations génétiques qui peuvent exister entre individus. Elle peut être appliquée pour les études de diversité microbienne avec les analyses de structuration intra ou interpopulation (Helentjaris *et al.*, 1986 ; Alippi *et al.*, 2002).

La technique de T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) est une technique similaire à la RFLP mais cette technique utilise des amorces marquées par des sondes fluorescentes permettant de déterminer après séparation électrophorétique le polymorphisme des fragments de restriction en position terminale et de caractériser la diversité de la population microbienne sans que l'étape de clonage soit nécessaire (Liu *et al.*, 1997 ; Lukow *et al.*, 2000).

En général, ces méthodes sont basées sur l'analyse de la taille des fragments, et on ne peut donc pas obtenir de lien direct entre la détection d'une bande de taille donnée et la présence d'un microorganisme particulier. Une bande est composée de fragments de même taille pouvant provenir de microorganismes différents. En RAPD, ARDRA ou RFLP, un organisme unique est à l'origine de plusieurs fragments. En T-RFLP, seul un fragment par organisme est détecté grâce à l'amorce fluorescente. Cependant il peut y avoir recouvrements de classes de taille de fragments pour des microorganismes différents. Les séquences des fragments de même taille forment parfois des groupes phylogénétiques, il existe des variations intra-espèces de la longueur de la région intergénique 16S-23S (Suzuki *et* Giovannoni, 1996).

La SSCP et la DGGE/TGGE sont des techniques d'analyse de fragments d'ADN basées sur les différences de mobilité électrophorétique dues à leur différente conformation des fragments moléculaires de même taille.

La technique SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) est basée sur le fait que dans un gel de polyacrylamide non dénaturant, les ADN simple brin même s'ils ne diffèrent entre eux que d'une base, peuvent adopter une conformation structurale suffisamment différente, pour qu'on puisse les détecter sous forme de deux bandes électrophorétiques distinctes. La SSCP permet de détecter le changement d'une seule base dans 99% des produits de PCR de 100 à 300 pb (Hayashi, 1991). La SSCP nécessite l'utilisation d'ADN témoin pour identifier les microorganismes auxquels correspondent les bandes (Widjoatmodjo *et al.*, 1995). Elle peut être utilisée pour accéder à la diversité d'une communauté bactérienne (Opelt *et* Berg, 2004 ; Moletta *et al.*, 2007).

La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) est fondée sur la séparation d'un double brin d'ADN dans un gel d'acrylamide en conditions de dénaturation croissante (Fischer *et* Lerman, 1983 ; Myers *et al.*, 1987). Deux molécules d'ADN proches, différant d'un seul nucléotide dans une zone à faible température de fusion, auront deux températures de fusion différentes. Lors d'une migration électrophorétique dans un gradient croissant de dénaturant, la mobilité décroît alors que les zones à faible température de fusion se dissocient.

La TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) : Cette technique a le même principe que la DGGE mais le gradient dénaturant chimique est remplacé par

un gradient de température qui augmente au cours de la migration (Zoetendal *et al.*, 1988 ; Eichner *et al.*, 1999).

Les techniques de DGGE/TGGE ont pour avantage le fait que la séparation ne dépend pas de la taille des amplicons mais plutôt de leur séquence nucléotidique, rendant la DGGE plus discriminante que les méthodes utilisant le fragment de restriction. En plus, les bandes d'intérêt peuvent être excisées et séquencées (Moeseneder *et al.*, 1999). Dans le chapitre suivant, je me propose de décrire en détail la technique de PCR-DGGE, qui est la principale technique utilisée dans mon travail, ainsi que son application en écologie microbienne.

La technique HMA (Heteroduplex Mobility Assay) est basée sur la formation des hétéroduplex stables entre des fragments d'ADN 16S dénaturés. La mobilité sur gel de polyacrylamide est fonction des structures secondaires recrées dans les régions non-appariées. Cette technique permet de différencier des populations bactériennes peu complexes (Espejo *et al.*, 1998 ; Bowyer *et al.*, 2000).

Les puces à ADN sont des multicateurs permettant de caractériser et quantifier des acides nucléiques dans un échantillon (Glaser, 2005). Elles apportent une solution innovante au problème ancien de la détection, de l'identification et du typage des bactéries dans un échantillon. Ces puces sont développées dans les laboratoires de recherche pour l'étude de la diversité et de l'évolution du monde bactérien et pour la caractérisation des communautés bactériennes constituées de centaines d'espèces. Des puces permettant d'identifier les bactéries présentes dans un échantillon sur la base de l'analyse des séquences d'ARNr 16S sont en développement. L'ADN total est extrait à partir d'un échantillon et l'ensemble des ADN codant pour les ARNr 16S sont amplifiés, en utilisant des amorces universelles, et hybridés sur des puces portant des sondes spécifiques de l'ARNr 16S des espèces recherchées.

I.11. La méthode de PCR-DGGE

I.11.1. Principe

Le principe de la DGGE est basé sur la séparation partielle d'un fragment d'ADN double-brin sous l'action de la chaleur ou d'un dénaturant (Fischer et Lerman, 1983). Une molécule composée en partie de la double hélice classique et en partie de deux simples-brins est fortement ralentie par rapport à une molécule double-brin ou complètement dénaturée.

La DGGE permet de séparer des fragments d'ADN de taille identique mais avec des séquences différentes. La séparation est basée sur la mobilité électrophorétique de l'ADN double brin dans un gel de polyacrylamide contenant un gradient linéaire croissant d'agents dénaturants (urée et formamide). L'électrophorèse est effectuée à une température constante entre 55 et 65°C, la plupart du temps à 60°C. Cependant, si le gradient augmente de façon linéaire, la dénaturation de l'ADN ne se fait pas de façon progressive tout au long de la molécule, mais de domaine en domaine, qui s'ouvrent plus ou moins rapidement en fonction de leur composition en bases AT (Adénine-Thymine) et GC (Guanine-Cytosine). La conformation spatiale du fragment d'ADN se modifie parallèlement à l'importance des domaines dénaturés ce qui limite sa mobilité électrophorétique (Muyzer *et al.*, 1996). Une résolution optimale est obtenue quand les fragments ne sont pas totalement dénaturés. Pour éviter la dénaturation totale du double brin, une structure à très haute température de fusion (très riche en GC) est associée lors de l'amplification. La PCR est alors réalisée avec l'amorce forward portant en 5' une séquence de 40 GC : le GC clamp (Sheffield *et al.*, 1989).

La mise au point de la technique dépend essentiellement du choix des amorces. Les amorces utilisées pour l'amplification déterminent la finesse et la spécificité de la méthode. Pour les bactéries, la cible la plus souvent utilisée pour l'amplification PCR est une des régions très conservée du génome qui inclut également des régions hypervariables. Les amorces sont conçues pour hybrider les régions conservées mais en enjambant des régions variables afin d'obtenir des amplicons de PCR possédant des différences de composition en paires de base qui sont spécifiques des espèces bactériennes et peuvent être séparées ensuite par DGGE (Ercolini, 2004). Les amorces permettent d'amplifier de 100 à 500 pb dans une zone à faible point de fusion. Le « GC clamp » doit être proche de l'extrémité amplifiée ayant le plus fort point de fusion. Il est donc nécessaire de connaître avant l'amplification les zones qui auront une température de fusion plus ou moins élevée. Le comportement du point de fusion des ADN double brins a été décrit par un modèle informatique développé par Lerman *et al.*, (1984). Le logiciel informatique est disponible, sous le nom de MacMeltTM (Biorad, Hercules, USA) et il peut calculer le profil de fusion des ADN et montrer les domaines théoriquement élevés et bas en stabilité d'une séquence connue.

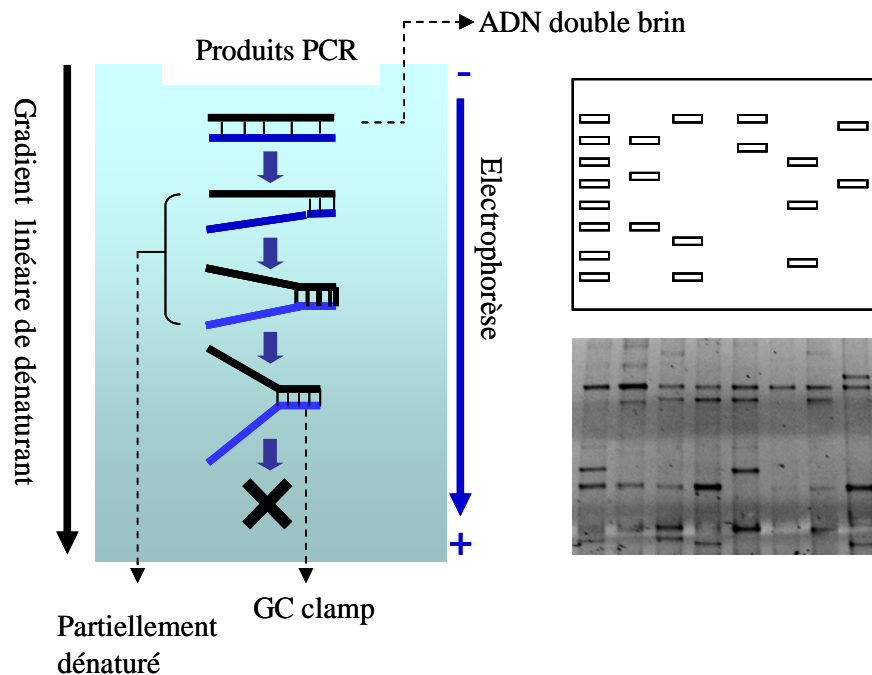


Figure 1.6. : Représentation schématique de la méthode PCR-DGGE :

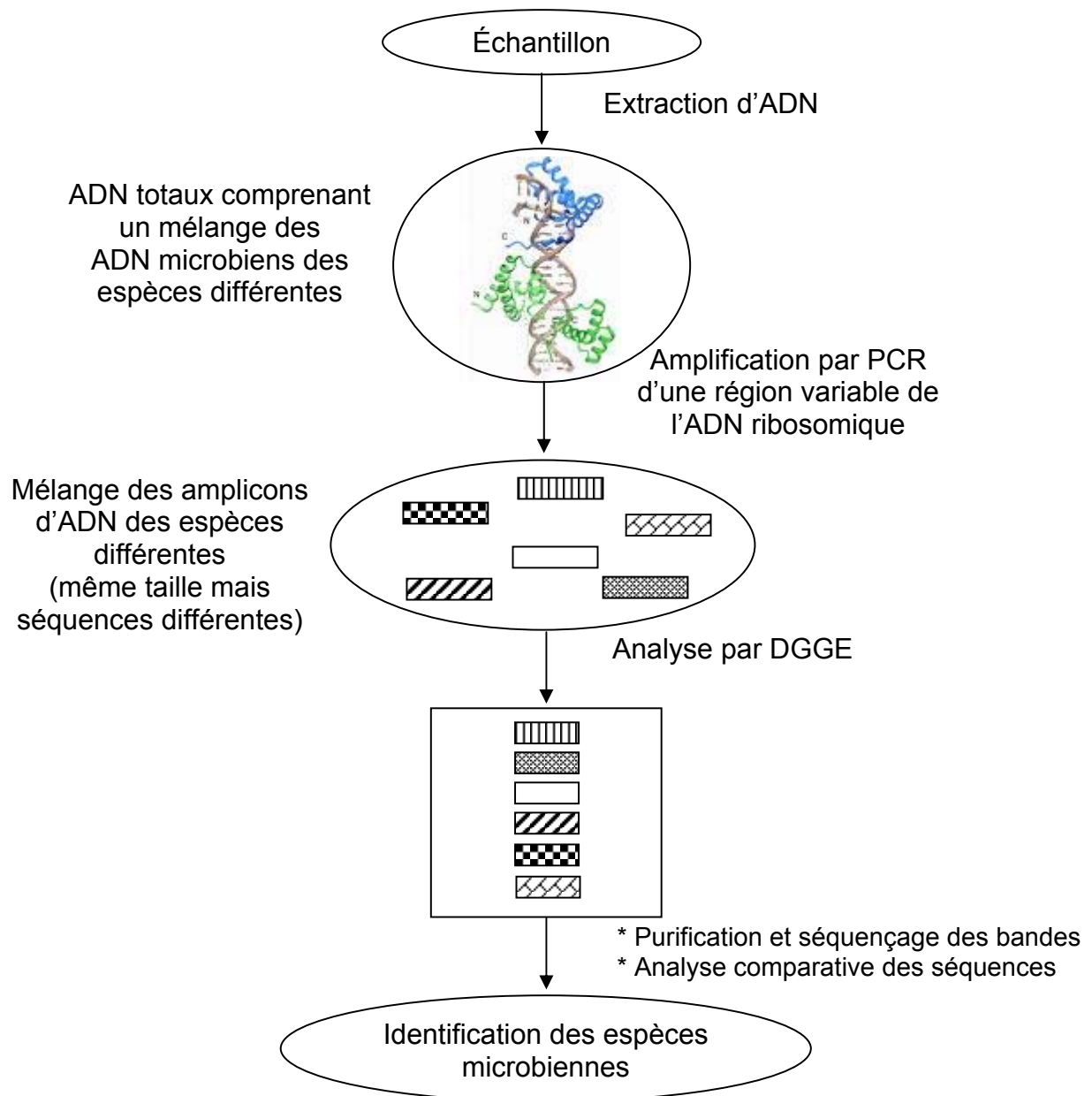
(A) : comportement d'un produit de PCR lors de la DGGE.

(B) : profil obtenu par DGGE après la séparation dans un gel DGGE et photo d'un gel après coloration au bromure d'éthidium.

La technique de PCR-DGGE est généralement appliquée en écologie microbienne parce qu'elle est capable de fournir une empreinte génétique de la communauté bactérienne dans un échantillon environnemental ou dans un produit alimentaire après extraction directe et globale des ADN. D'abord, l'échantillon est soumis à l'extraction de tous les microorganismes puis les ADN sont extraits des microorganismes en une seule étape pour obtenir un mélange contenant l'ADN total des espèces bactériennes présentes dans l'échantillon. Ensuite, l'ADN total est utilisé comme cible de l'amplification par PCR des régions d'intérêt. Les produits amplifiés obtenus sont composés d'un mélange des amplicons des espèces bactériennes de l'échantillon initial. Tous les amplicons ont la même taille mais leurs séquences sont différentes, par conséquent ils peuvent être séparés par la DGGE.

Le résultat final est une empreinte génétique spécifique des espèces microbiennes présentes dans l'échantillon. Le profil électrophorétique présente une série de bandes spécifiques de la populations microbienne de l'échantillon analysé dont on considère que chaque bande représente un microorganisme (Muyzer *et al.*, 1993, Ercolini, 2004).

Figure I.7. : Diagramme des différentes étapes de l'analyse PCR-DGGE. Application à l'analyse d'échantillons environnementaux ou d'échantillons alimentaires (Ercolini, 2004).



I.11.2. Les applications de la PCR-DGGE

I.11.2.1. Étude de la biodiversité de la communauté microbienne dans l'environnement

Depuis son introduction par Muyzer *et al.* (1993) en écologie microbienne, la PCR-DGGE a été employée avec succès pour étudier les communautés microbiennes dans l'environnement. Cette technique est habituellement employée pour évaluer la diversité de la communauté et pour déterminer sa dynamique en

réponse aux variations environnementales. Les plus récentes applications portent sur l'étude de la structure et de l'évolution des communautés bactériennes du sol (Avrahami *et al.*, 2003 ; Edenborn *et al.*, 2007); de la mer (Bano et Hollibaugh, 2002 ; Pinhassi *et al.*, 2004) ; des rivières (Sekiguchi *et al.*, 2002 ; Lyautey *et al.*, 2004) ; des étangs (Crump *et al.*, 2003 ; Van der Gucht *et al.*, 2005), de l'eau des stations d'épuration (Liu *et al.*, 2006, Moura *et al.*, 2007), du pétrole (Phung *et al.*, 2004), du bois (Landy *et al.*, 2007), des échantillons cliniques (Burton *et al.*, 2003 ; Donskey *et al.*, 2003).

1.11.2.2. Suivi et identification de la communauté microbienne au cours des fermentations

Le grand potentiel montré par la PCR-DGGE pour analyser les échantillons environnementaux a stimulé les microbiologistes pour étudier la possibilité de son application dans le suivi des fermentations microbiennes. Parmi les premiers qui s'y sont intéressés, Ampe *et al.* (1999) ont étudié la distribution spatiale des microorganismes dans des boules de Pozol, un aliment mexicain à base de maïs fermenté. Des bactéries lactiques ont été identifiées par le séquençage des fragments d'ADN purifiés à partir du gel DGGE. Couplée à des techniques d'hybridation et à des dosages des produits de fermentation, la DGGE a permis d'identifier différentes bactéries acido-lactiques et de préciser leur rôle dans le processus de fermentation. En plus, en comparant les résultats obtenus par l'analyse de la flore bactérienne par DGGE et ceux de l'analyse microbienne traditionnelle, les auteurs ont conclu que les méthodes de culture-indépendantes ont semblé être meilleures que les méthodes classiques pour étudier les aliments fermentés. Pour le même produit de Pozol, Ben Omar et Ampe (2000) ont étudié la flore microbienne responsable de la fermentation en examinant la dynamique de la communauté microbienne au cours de la production de ce produit. Ils ont identifié les espèces microbiennes dominantes à différent stades de la fermentation, et montré la responsabilité des espèces importantes de la fermentation et de la production des composés essentiels. Ainsi, *Streptococcus* spp. a dominé le processus total tandis que les bactéries lactiques hétérofermentaires telles que *Lactobacillus fermentum* étaient présentes dès le début de la fermentation mais ont ensuite été remplacées par les bactéries lactiques homofermentaires (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus delbrueckii*). L'empreinte génétique a donc permis de donner

une image de la communauté bactérienne à un instant donné. C'est la succession de ces images qui permet d'aboutir à l'établissement de la dynamique de fermentation. Cette application est intéressante puisqu'elle permet de suivre les fluctuations bactériennes au cours d'un traitement technologique, cet aspect pourrait amener à terme à la maîtrise des procédés de fabrication de produits alimentaires fermentés. Dans une autre étude concernant la fermentation de pâte de manioc, Miambi *et al.* (2003) ont identifié dix espèces bactériennes en utilisant les mêmes techniques culture-dépendantes et culture-indépendantes. Les auteurs ont montré que *Lactobacillus manihotivorans*, *Lactobacillus fermentum* et *Lactobacillus crispatus*, qui ont été identifiés par séquençage des bandes DGGE, ne pouvaient pas être trouvés par des techniques classiques.

Les produits laitiers sont les plus étudiés parmi les produits alimentaires et l'approche de PCR-DGGE a été récemment exploitée pour surveiller la fermentation de ces produits. Ercolini *et al.* (2001 ; 2003) ont travaillé successivement sur la microflore de deux fromages : la Mozzarella d'origine italienne et le Stilton d'origine anglaise. Par séquençage des fragments recueillis après DGGE, ils ont pu identifier, dans le fromage italien, des bactéries lactiques thermophiles comme *Streptococcus thermophilus*, des bactéries lactiques mésophiles comme *Lactococcus lactis*, et des bactéries assimilées à des contaminations comme *Alishewanella fetalis*. Le fromage britannique quant à lui semble contenir une flore beaucoup plus complexe, dont la répartition n'est pas homogène entre le cœur et la croûte. Cette méthode a été aussi appliquée pour caractériser des populations microbiennes dominantes dans le fromage Cabrales espagnol (Flórez *et al.*, 2006) et le fromage Domiati, un fromage traditionnel égyptien (El-Baradei *et al.*, 2007).

La PCR-DGGE a aussi servi à l'étude de boissons fermentées. Les communautés bactériennes présentes pendant la fermentation du malt à whisky ont pu être ainsi étudiées (Van Beek et Priest, 2002). Les auteurs ont montré que l'ensemble des *Lactobacillus* présents joue un rôle important dans les premières étapes de la réaction, alors qu'en fin de fermentation seuls 2 souches de *Lactobacillus* homofermentaires dominent.

La communauté microbienne intervenant pendant la maturation de la vanille en Indonésie a aussi été étudiée par cette approche (Röhling *et al.*, 2001). Les auteurs ont trouvé une présence significative de *Bacillus* et d'autres

microorganismes théoriquement non cultivables durant le traitement à haute température de la gousse.

1.11.2.3. Contrôle de qualité des produits alimentaires

La PCR-DGGE peut être appliquée pour déterminer les flores bactériennes dans le produit fini, et contrôler sa qualité biologique. Silvestri *et al.* (2007) ont utilisé la PCR-DGGE en la combinant avec une méthode de culture classique pour la surveillance de la qualité hygiénique du Ciauscolo, un salami traditionnel italien. Cette méthode a permis de prouver la qualité de ce produit en montrant l'absence des bactéries pathogènes au niveau artisanal ainsi qu'au niveau industriel.

Hovda *et al.* (2007a, b) l'ont utilisée pour caractériser les populations bactériennes présentes dans les filets de flétan et de morue d'élevage emballés sous atmosphère contrôlée. Ils ont montré que la méthode est applicable pour identifier les microorganismes responsables de la détérioration des poissons. Les bactéries principales dans un emballage sous atmosphère contrôlée et emballage normal étaient *P. phosphoreum*, *B. thermosphacta* et *Pseudomonas spp.*

Dans la même optique, la PCR-DGGE a permis de surveiller la qualité hygiénique de la salade (Handschr *et al.*, 2005) et des bactéries de la famille des *Microbacteriaceae* comme *M. testaceum*, *A. junii*, *R. tritici* et des *Enterobacteriaceae* comme *Klebsilla pneumoniae* et *Enterobacter aerogenes* ont été trouvées. Cette technique pourrait être utilisée pour détecter les microorganismes pathogènes présents dans les produits alimentaires (Ji *et al.*, 2004). La comparaison de la microflore de l'aliment avec un mélange de bactéries témoins devrait permettre de donner l'état de la qualité sanitaire escomptée du produit, plus rapidement qu'avec les techniques d'analyse classique. En effet, la durée d'une analyse totale des bactéries en DGGE, pour une trentaine d'échantillons, nécessite moins de 24 heures, ce qui est le temps minimal nécessaire pour la plupart des analyses classiques.

La PCR-DGGE a été également appliquée pour contrôler la qualité hygiénique de l'eau minérale. Dewettinck *et al.* (2001) ont ainsi montré qu'il était possible d'obtenir des empreintes génétiques à partir des eaux souterraines et de l'eau minérale commerciale. La présence des microorganismes non cultivables a été aussi prouvée par cette méthode.

L'utilisation de cette technique par Fasoli *et al.* (2003) a permis d'identifier les microorganismes présents dans des yaourts probiotiques et des préparations probiotiques lyophilisées. Des témoins de migrations ont été créés en utilisant les bactéries généralement rencontrées dans les produits probiotiques. La comparaison de produits commerciaux à ces modèles a montré que certains microorganismes non déclarés sont présents dans les produits.

1.11.2.4. Authentification et identification d'origine géographique

Cette approche globale pourrait servir pour le contrôle des appellations. Coppola *et al.* (2001) ont comparé différents modes de fabrication de fromage : une méthode dite artisanale et une méthode plus industrielle. Ils ont montré que la microflore du fromage dépend en partie du mode de production. De ce fait, la technique de PCR-DGGE pourrait être assimilée à un outil de diagnostic pour les produits qui doivent porter la mention « produit artisanal ».

Une application originale et effective de la PCR-DGGE pour grouper des produits alimentaires a été décrite par Mauriello *et al.* (2003). Ces travaux sur la flore initiatrice de la production de Mozzarella, un fromage traditionnel italien, ont montré que la composition des starters dépendait fortement de leur origine géographique. De plus, les caractères organoleptiques des différents fromages sont eux aussi dépendants de l'origine géographique des flores initiateurs. De ce fait les empreintes génétiques pourraient être un bon moyen pour protéger les labels de type AOC (Appellation d'Origine Contrôlée) ou IGP (Indication Géographique Contrôlée) dont le principe d'attribution est un cahier des charges axé essentiellement sur l'origine de la zone de production et le savoir-faire humain.

Le travail de Leasing (2005) a porté sur l'optimisation des conditions de la PCR-DGGE pour la caractérisation et la comparaison des communautés bactériennes des poissons venant de différentes régions de France et de Thaïlande. L'auteur a montré qu'il est possible de différencier les poissons d'origine différente par les profils de DGGE obtenus.

Le Nguyen *et al.* (2008a) ont travaillé sur la détermination de l'origine géographique du poisson-chat (*Pangasius*) du Vietnam par la PCR-DGGE. Les poissons sont prélevés dans des fermes aquacoles différentes et pendant 2 saisons différentes, la saison des pluies et la saison sèche. Ce travail représente un chapitre de cette thèse. Les profils DGGE des populations bactériennes des différentes

fermes étaient différents et spécifiques pour chaque site. La notion de code barre génétique est ainsi apparue (Montet, 2003) car le gel DGGE pourrait être utilisé comme un code barre pour certifier l'origine géographique des poissons.

I.11.3. Les limites de la PCR-DGGE

Comme toutes les techniques moléculaires, la PCR-DGGE est elle aussi soumise à de nombreux biais qui peuvent forcément entacher l'analyse de la diversité microbienne d'un échantillon. Ces biais peuvent intervenir à différents stades de l'analyse : lors de l'échantillonnage, de la conservation de l'échantillon, de la lyse cellulaire lors de l'extraction des ADN, de l'amplification de l'ADNr 16S par PCR, de la migration électrophorétique sur le gel DGGE et du manque de sensibilité de la méthode pour les souches présentes en faible quantité.

I.11.3.1. Echantillonnage et conservation des échantillons

L'échantillon prélevé dans le milieu devra rendre compte le plus fidèlement possible de l'ensemble des espèces présentes dans l'environnement. Il est donc important de connaître les conditions physico-chimiques des échantillons.

Dans le cas où il n'est pas possible de traiter (extraction d'ADN) l'échantillon dès son prélèvement, il est nécessaire de le stocker dans les conditions qui permettent de conserver l'intégrité des acides nucléiques. Rochelle *et al.* (1994) ont comparé les effets de différentes techniques de conservation sur la composition de banque de clones d'ADNr 16S. Les échantillons congelés rapidement et stockés sous atmosphère anaérobie présentent une diversité bien plus importante que les échantillons conservés en aérobose ou congelés plus tardivement. Selon les auteurs, la congélation tardive peut être source d'enrichissement de certains phylotypes.

Le lavage, le transport ou les procédures de refroidissement peuvent influencer les espèces microbiennes présentes dans l'échantillon en augmentant ou en réduisant le nombre et les espèces pouvant être détectées par la PCR-DGGE (Ercolini, 2004).

I.11.3.2. Extraction des acides nucléiques

L'extraction de l'ADN constitue une étape clé. La première étape de l'extraction est la lyse cellulaire, qui a pour effet de casser les membranes cellulaires

des microorganismes en endommageant le moins possible les acides nucléiques. L'efficacité de la technique de lyse cellulaire sur un échantillon est d'autant plus difficile à déterminer que l'on ne connaît pas le type et la quantité de cellules microbiennes à analyser. Toutes les espèces microbiennes n'ont pas la même sensibilité aux agents lytiques du fait des compositions différentes de leur paroi. Les études ont prouvé que les bactéries à Gram positif sont plus difficiles à lyser que les bactéries à Gram négatif, que les spores et les petites cellules qui résistent mieux à la lyse cellulaire (Kuske *et al.*, 1998 ; Hoshino et Matsumoto, 2005).

La purification des acides nucléiques peut s'avérer difficile sur des échantillons non homogènes. Les matrices alimentaires comme les lipides, protéines, polysaccharides et sels diminuent les rendements d'extraction et peuvent être retrouvées dans les extraits d'ADN. Ces résidus pourraient également agir comme inhibiteurs lors de l'amplification par PCR. Il est aussi parfois nécessaire de simplifier la technique d'extraction afin d'avoir des ADN de meilleure qualité (Wilson, 1997).

1.11.3.3. Amplification par PCR

L'amplification par PCR est l'une des sources majeures de biais dans l'étude de la diversité microbienne. Certains brins subissent une amplification préférentielle par PCR (Reysenbach *et al.*, 1992). Cette amplification préférentielle pourrait être provoquée par la réhybridation d'ADN cibles, ce qui empêche l'hybridation des amorces (Suzuki et Giovannoni, 1996). Elle peut être aussi liée au choix des amorces (Brunk et Eis, 1998), à la composition en G+C de la séquence (Dutton *et al.*, 1993) et aux séquences adjacentes de la zone à amplifier (Hansen *et al.*, 1998).

Un mélange d'ADN microbien d'une communauté peut ainsi n'être que partiellement amplifié par PCR, avec pour conséquence l'obtention d'un produit dont une partie des membres originaux de la communauté est absente. Cela représente un problème pour l'analyse de la communauté microbienne par la PCR-DGGE parce que le nombre d'espèces détectées peut ne pas refléter complètement la diversité de l'échantillon.

Le choix des amorces et la région cible pour l'amplification est aussi important. Pour un même échantillon, l'image de la population microbienne peut varier en fonction de la région variable de l'ADN 16S amplifiée (Ercolini, 2004).

Un autre problème est la formation de molécules chimériques. Lors de l'appariement, des simples brins d'ADN vont s'associer entre eux plutôt qu'avec les amorces (Liesack *et al.*, 1991 ; Kopczynski *et al.*, 1994). De plus, la formation de molécules hétéroduplex au cours de l'amplification peut rendre difficile l'interprétation de la diversité microbienne par DGGE (Ruano et Kidd, 1992). Une molécule d'ADN hétéroduplex a deux brins de 2 produits PCR différents, qui peuvent être formés par la réhybridation des produits dénaturés de PCR. En raison des mésappariements entre le double brin dans les molécules hétéroduplex, leur température de fusion est plus basse que celle des molécules homoduplex.

La présence de l'ADN de contaminants dans le tampon de réaction, de l'eau ou les tubes peut aussi fausser le résultat de l'amplification en augmentant la diversité de l'échantillon (Tanner *et al.*, 1998).

1.11.3.4. La DGGE

Une des limitations de la DGGE est le gel d'acrylamide qui ne permet qu'une séparation des fragments ayant une longueur maximale de 500 paires de base (Myers *et al.*, 1985). Une identification fiable des espèces microbiennes est difficile car les séquences des bandes de DGGE que l'on compare à celles des bases de données peuvent être identiques au sein du même genre bactérien d'autant plus que les séquences comparées sont petites. De plus, il n'est pas toujours possible de séparer les fragments d'ADN qui ont certaines variations dans les séquences (Vallaey *et al.*, 1997).

La co-migration des fragments d'ADN peut être un problème pour la recherche des séquences particulières. En fait, malgré des séquences différentes, les propriétés de fusion des brins d'ADN peuvent être quelquefois identiques. Dans ce cas, les gels DGGE ne peuvent permettre la séparation des bandes (Ercolini, 2004).

La présence de plusieurs copies du gène de l'ARNr 16S dans le génome bactérien avec des séquences différentes peut être un autre obstacle. Une espèce ayant plusieurs copies du gène de l'ARNr peut donner un profil de DGGE caractérisé par plusieurs bandes, ce qui conduit à la surestimation de la diversité de la communauté microbienne (Nübel *et al.*, 1996).

I.11.3.5. Limite de la détection bactérienne

La sensibilité de la PCR-DGGE est basée sur la réaction de la PCR et sa capacité d'amplifier l'ADN bactérien d'un échantillon complexe. Pour obtenir les meilleurs résultats, le produit doit être autant pur et concentré que possible. Généralement, la sensibilité pour un échantillon alimentaire est réduite, due à un éventail de substances inhibitrices (Wilson, 1997). La limite de détection est dépendante des espèces considérées et oscille entre 10^2 - 10^5 UFC/mL (Temmerman *et al.*, 2003 ; Fasoli *et al.*, 2005 ; Silvestri *et al.*, 2007), tandis que le seuil de détection d'*E. coli* dans l'eau minérale varie entre 10^4 et 10^8 UFC/mL (Dewettinck *et al.*, 2001). Plusieurs études différentes indiquent cependant que des populations bactériennes qui composent 1% ou plus de la communauté totale peuvent être détectées par la PCR-DGGE (Muyzer *et al.*, 1993 ; Murray *et al.*, 1996).

Bien que la méthode de PCR-DGGE soit souvent employée, il y a encore quelques inconvénients qui peuvent réduire son efficacité pour analyser la communauté bactérienne. Malgré ces limites, la DGGE est fortement préférée et considérée comme une des meilleures techniques permettant le suivi de l'écologie bactérienne d'un aliment de façon globale, rapide et reproductible (Ercolini, 2004).

I.12. Rep-PCR (Repetitive element sequence-based polymerase chain reaction)

I.12.1. Technique

La Rep-PCR est aussi une technique basée sur l'amplification de la séquence d'ADN pour identifier et classer des microorganismes. Cette technique s'est avérée extrêmement fiable, reproductible, rapide et fortement discriminatoire (Versalovic *et al.*, 1994).

La Rep-PCR utilise les amorces complémentaires aux séquences répétitives fortement conservées présentes en grand nombre de copies multiples dans les génomes de la plupart des bactéries à Gram négatif et de plusieurs bactéries à Gram positif. Cette technique permet d'amplifier toutes les zones du génome qui contiennent des séquences nucléotidiques répétitives palindromiques (Lupski et Weinstock, 1992). Trois familles de séquences nucléotidiques répétitives ont été identifiées, y compris l'élément de REP (pour repetitive extragenic palindromic) contenant 35-40 pb (Higgins *et al.*, 1988), l'élément d'ERIC (pour enterobacterial repetitive intergenic consensus) contenant 124-127 pb (Hulton *et al.*, 1991) et l'élément de BOX contenant 154 pb (Versalovic *et al.*, 1994). Ces séquences sont situées dans la

position distincte et intergénique autour du génome et sont très conservées au sein d'une même espèce malgré l'existence de variation infra-spécifique (Versalovic *et al.*, 1994 ; Rademaker et De Bruijn, 1997). L'amplification en Rep-PCR permet donc d'obtenir des amplicons de taille variable qui sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le profil électrophorétique alors obtenu représente une signature hautement discriminante qui permet de différencier les microorganismes.

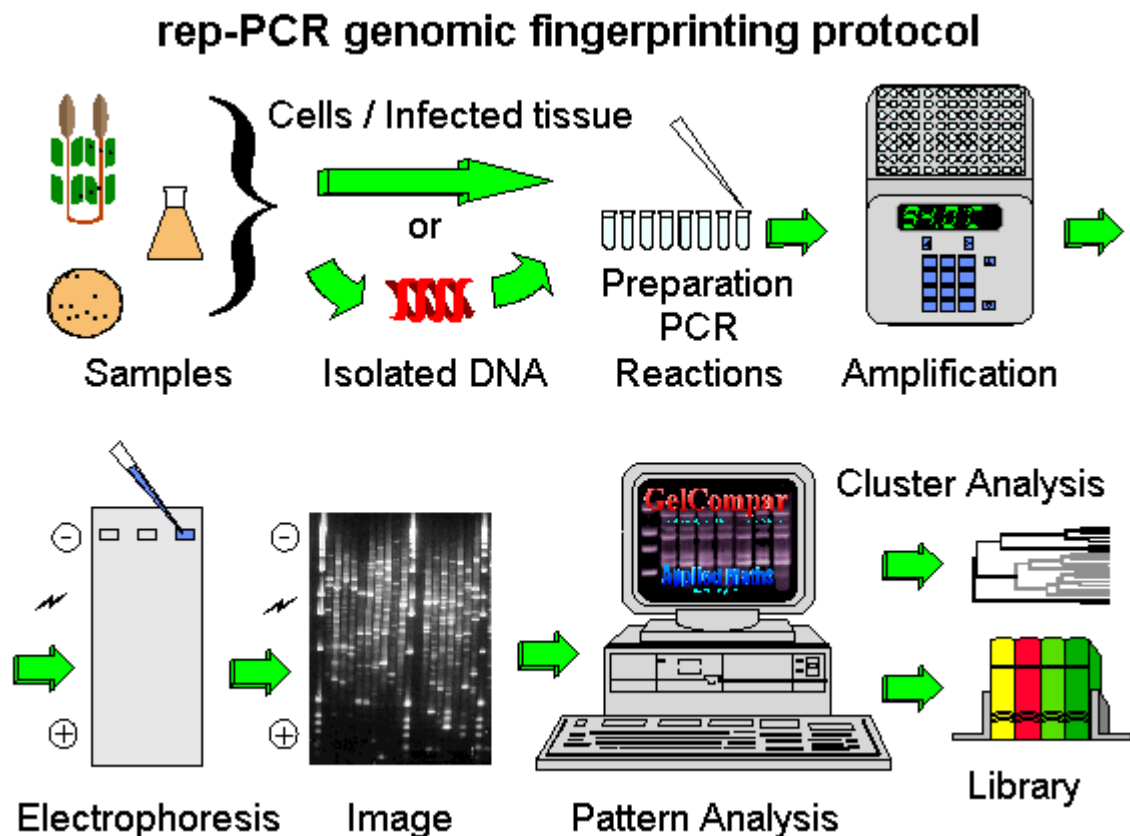


Figure I.8. : Principe de la Rep-PCR (source : Rademaker et de Bruijn, 1997).

I.12.2. Applications de la Rep-PCR

Un avantage distinct de la Rep-PCR est que les amorces peuvent être employées pour une variété de bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Ceci signifie qu'aucune connaissance de la structure génomique ou de la nature des séquences répétées indigènes n'est nécessaire (Versalovic *et al.*, 1994). De plus, Wood *et al.* (1993), Versalovic *et al.* (1994) proposent d'utiliser le tampon de Gitschier qui contient des tensioactifs qui permettent d'amplifier l'ADN à partir de cellules bactériennes entières, ceci facilite son application et permet une différenciation rapide des bactéries.

La Rep-PCR a été appliquée avec succès dans les domaines médical (Wood *et al.*, 1993), agricole (Prabhu *et al.*, 2007) et alimentaire (Callon *et al.*, 2004 ; Casalta *et al.*, 2004 ; Jurkovic *et al.*, 2006) pour la diversité microbienne. De plus, la Rep-PCR est un outil important pour l'identification et la classification des bactéries. Cette méthode a été appliquée pour identifier des genres divers de bactéries, comme *Escherichia coli* (Dombek *et al.*, 2000 ; McLellan *et al.*, 2003), *Xanthomonas* (McDonald et Wong, 2001 ; Aritua *et al.*, 2007), *Paenibacillus* (Genersch et Otten, 2003), *Bifidobacterium* (Shuhaimi *et al.*, 2001), *Clostridium difficile* (Rahmati *et al.*, 2005), *Bacillus licheniformis* (Whitaker *et al.*, 2004). Des applications de la Rep-PCR ont été également rapportées pour les moisissures en identifiant le genre *Aspergillus* (Van Belkum *et al.*, 1993) et *Fusarium* (Edel *et al.*, 1995).

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

II.1. Échantillonnage des poissons

II.1.1. Échantillonnage des bars de France

Les bars (*Dicentrarchus labrax*) d'origine française proviennent de différentes régions de France : de la société Viviers du Gois (Beauvoir sur Mer), de la société Aquanord (Gravelines), de l'Ifremer Palavas (Montpellier) et de la société « Les bars du soleil » à Sète (Tableau II.1 et Figure II.1). Après prélèvement aseptique au moyen de gants en latex et d'emballages plastiques stériles, ils ont été envoyés au laboratoire du CIRAD sous forme congelée. Les échantillons ont été conservés dans une chambre froide à -20°C durant toute la durée de l'expérimentation.

Tableau II.1 : Liste des fermes aquacoles françaises où ont été prélevés les échantillons de bars.

N°	Sociétés	Lieu	Aquarium	Nbre de poissons	Note
1	Aquanord	Gravelines		3	
2	Viviers du Gois	Beauvoir sur Mer		3	
			E	1	Circuit fermé
3	IFREMER		K	3	Circuit fermé
	Palavas	Montpellier	ASC	5	Circuit fermé
			C1	5	Circuit ouvert
4	Les bars du soleil	Sète		3	

Circuit fermé : l'aquarium est alimenté par de l'eau de mer qui est filtrée et recyclée en continu.

Circuit ouvert : l'eau est pompée dans la mer et donc renouvelée en permanence.



Figure II.1 : Région d'échantillonnage en France.

(http://www.septimanie-export.com/commun/images/atlas/cartes/carte_france_fr.gif)

II.1.2. Échantillonnage des poissons-chats *Pangasius* au Vietnam

L'échantillonnage a été réalisé au Vietnam au cours de 2 saisons : la saison des pluies (Octobre 2005) et la saison sèche (Février 2006).

Les poissons-chats *Pangasius* (*Pangasius hypophthalmus*) sont élevés dans des fermes de la région d'An Giang dans le delta du Mékong (Tableau II.2, Figure II.2 et Figure II.3). Cette région fournit à peu près 2/3 de la quantité des poissons-chats *Pangasius* destinés à l'exportation (200 000 tonnes en 2007) (Vietnam Fisheries Information Center (FICen), 2008). Le climat du delta du Mékong se caractérise par une température élevée relativement stable aux alentours de 29°C, une humidité importante avec 2 saisons : saison des pluies et saison sèche.

Les poissons prélevés pèsent entre 1000 g et 1500 g et sont élevés pendant 8 à 10 mois. Cinq à seize poissons sont prélevés par localisation.

Tableau II.2. : Liste des fermes aquacoles du Vietnam où ont été prélevés les échantillons de poissons-chats *Pangasius*.

N°	Région	Nom du district	Distance de Cantho (Laboratoire universitaire)	Nombre de poissons	Saison d'échantillonnage
1	An Giang	Chau Phu	40 km	16	Pluies et sèche
2	An Giang	Chau Doc	60 km	16	Pluies et sèche
3	An Giang	An Phu	30 km	16	Pluies et sèche
4	An Giang	Tan Chau	50 km	13	Pluies et sèche
5	An Giang	Phu Tan	45 km	5	Pluies

Tous les poissons ont été prélevés vivants. Pour limiter l'effet de l'aliment, la capture a été réalisée tôt le matin, quand les poissons sont à jeun. Dès la sortie de l'eau, les poissons sont conservés dans des sacs plastiques stériles. Les sacs plastiques contenant les poissons ont été ensuite recouverts de glace dans une boîte isotherme et transportés jusqu'au laboratoire de l'Université de Cantho à environ 60 kms des fermes. Cette procédure évite une contamination indésirable pouvant fausser les résultats de la détermination de l'origine.

Au laboratoire, les ouïes, la peau et les intestins ont été séparés du reste du poisson et congelés séparément à – 20°C de façon aseptique. Ces échantillons ont été acheminés vers les laboratoires du CIRAD à Montpellier par avion, à l'état congelé.

Figure II.2. : Région d'échantillonnage au Vietnam (www.havenworks.com)

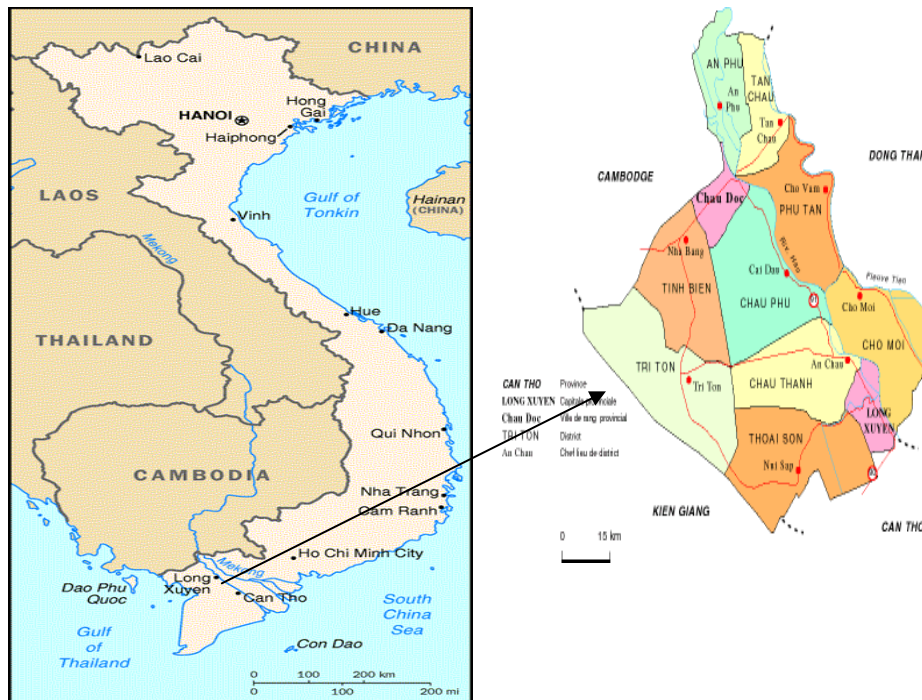


Figure II.3. : Photo de la ferme aquacole du district de Chau Phu, région d'An Giang dans le delta du Mékong au Vietnam (Photo Le Nguyen, 2006).

II.1.3. Échantillonnage des poissons-chats *Pangasius* au Cambodge

L'échantillonnage a été réalisé au Cambodge pendant la saison sèche (Mars 2006). Les poissons-chats *Pangasius* (*Pangasius hypophthalmus*) sont élevés dans des fermes expérimentales de l'Université Royale d'Agriculture au district de Chamcar Daung, Phnom Penh et au district de Samroung, province de Siem Reap, Cambodge (Tableau II.3. et Figure II.4). Le prélèvement et le stockage des poissons ont été réalisés selon la même procédure qu'au Vietnam. Trois poissons sont prélevés par localisation.

Tableau II.3. : Liste des fermes aquacoles du Cambodge où ont été prélevés les échantillons de poissons-chats *Pangasius*.

N°	Provinces	Nom du district	Distance de Phnom Penh (Laboratoire universitaire)	Nombre de poissons	Saison d'échantillonnage
1	Phnom Penh	Chamcar Daung	10 km	3	sèche
2	Siem Reap	Sam Rong	100 km	3	sèche



Figure II.4. : Région d'échantillonnage au Cambodge (www. wordcollision.wordpress.com).

II.1.4. Échantillonnage de l'eau de l'étang d'élevage des poissons-chats *Pangasius* au Vietnam

Afin d'établir la relation entre la communauté bactérienne du poisson et celle de l'environnement dans lequel le poisson est élevé, un échantillon d'eau a été prélevé dans le même bassin que le poisson. L'échantillonnage a été réalisé pendant la saison sèche (Février 2006) (Tableau II.4). 50 mL d'eau ont été prélevés dans des flacons stériles. Pour chaque étang, 3 répétitions ont été réalisées. Les flacons contenant l'eau ont été ensuite recouverts de glace et mis dans une boîte isotherme puis transportés jusqu'au laboratoire de l'Université de Cantho à environ 60 kms des fermes. Au laboratoire, l'eau a été filtrée sur des filtres Whatman de 0,2 µm en acétate de cellulose. Les filtres ont été ensuite stockés à -20°C et acheminés vers les laboratoires du CIRAD à Montpellier par avion.

Tableau II.4. : Liste des fermes du Vietnam où ont été prélevés les échantillons d'eau.

N°	Régions	Nom du district	Distance de Cantho (Laboratoire universitaire)	Nombre d'échantillons	Saison d'échantillonnage
1	An Giang	Chau Phu	40 km	3	sèche
2	An Giang	Chau Doc	60 km	3	sèche
3	An Giang	An Phu	30 km	3	sèche
4	An Giang	Tan Chau	50 km	3	sèche

II.1.5. Échantillonnage pour l'étude de l'environnement de travail dans une usine du Vietnam

Les *Pangasius* (*Pangasius hypophthalmus*) ont été collectés par des pêcheurs professionnels dans des fermes aquacoles du delta du Mékong et transportés vivants à l'usine dans des bateaux viviers. Les poissons ont été ensuite transformés par l'usine dans la même journée.

Cette usine vietnamienne, dont le nom est volontairement tenu secret, sort 2 produits principaux : les filets de poisson et le poisson entier étripé. A l'époque de notre étude, la demande en filets de poissons étant importante, la ligne de transformation était donc presque toujours occupée par ce produit. La capacité était à peu près de 30 tonnes par jour.

La première étape de transformation du filet, après l'étape de réception, consiste à égorger pour saigner et laver les poissons dans des bacs d'eau chlorée à

50 ppm. Ils sont ensuite pesés et filetés. Les filets sont pelés, lavés à nouveau, pesés et congelés séparément (IQF) dans un congélateur tunnel à bande en froid mécanique à -40°C. Les filets sont ensuite emballés dans des cartons étiquetés puis stockés en chambre froide à -20°C. C'est sur cette ligne de transformation que nous avons prélevé nos échantillons (Figure II.5).

A la fin de chaque journée de production, une procédure de nettoyage et de désinfection totale est appliquée. Le nettoyage est réalisé avec de l'eau à basse pression contenant un détergent moussant. La désinfection est conduite avec une solution d'hypochlorite de sodium à 200 ppm et le matériel est ensuite rincé avec de l'eau de source.

Les échantillons de poissons ont été prélevés au cours du processus de transformation, avant et après chaque traitement (Figure II.6). Les poissons ou les filets de poisson sont prélevés dans des sacs stériles à chaque étape. Trois répétitions ont été faites pour chaque étape. Les sacs contenant les échantillons ont été ensuite recouverts de glace dans des boîtes isothermes et transportés jusqu'au laboratoire de l'Université de Can Tho à environ 30 kms de l'usine. Au laboratoire, les échantillons ont été congelés à -20°C jusqu'à l'extraction des ADN. L'extraction des ADN bactériens est réalisée selon le même protocole qu'au laboratoire du CIRAD. Les extraits d'ADN ont été ensuite acheminés congelés vers le laboratoire du CIRAD à Montpellier par avion.

Les échantillons dits « environnementaux » ont été prélevés à partir des surfaces de traitement au cours de la transformation et après le nettoyage et la désinfection (Figure II.6) par écouvillonnage avec un écouvillon stérile (Copan, Italia) sur une surface d'à peu près 100 cm². La superficie de la surface d'échantillonnage n'est cependant pas très précise car l'échantillonnage a été réalisé sur différentes surfaces telles que le bac de lavage, la table de transformation, le panier de pesage, la bande du convoyeur... L'écouvillon a été humecté préalablement avec de l'eau peptonée (Bio-Rad, France) à 0,1% w/v. Chaque écouvillon est placé après prélèvement dans un sac stérile pour Stomacher et congelé à -20°C jusqu'à l'extraction des ADN. Ces extraits d'ADN ont été ensuite acheminés congelés vers le laboratoire du CIRAD à Montpellier par avion.



Figure II.5. : Ligne de transformation du filet de *Pangasius* dans l'usine vietnamienne (photo Le Nguyen, 2007).

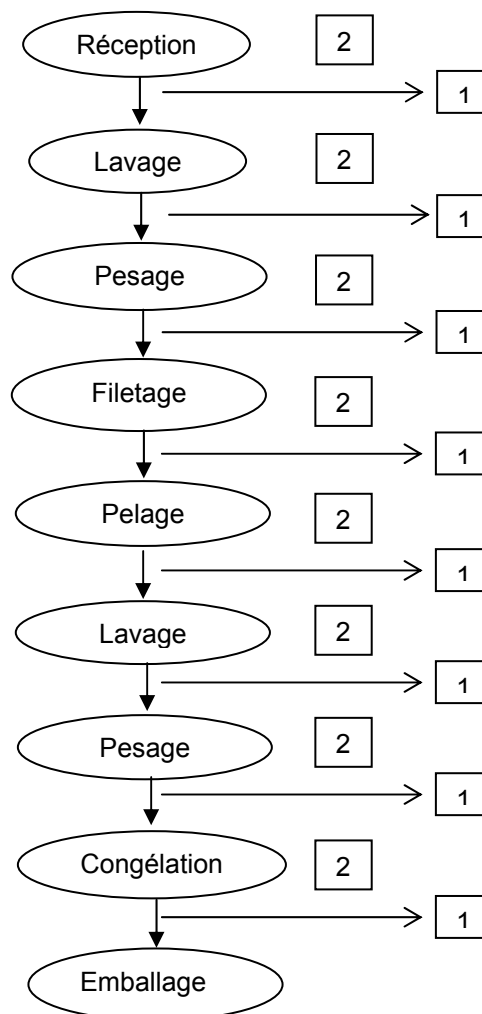


Figure II.6. : Plan d'échantillonnage des filets de poisson (1) et du matériel (2) au cours du processus de transformation et après lavage et désinfection.

II.1.6. Échantillons de Tilapias

Les poissons sont des Tilapias hybrides (*Oreochromis niloticus* x *Sarotherodon melanotheron*) élevés dans des aquariums d'eau douce tempérée à 27°C au CIRAD, campus Lavalette, Montpellier. Ils ont été retenus pour leur facilité d'approvisionnement et leur historique connu. En effet, il était impossible d'étudier l'effet des traitements technologiques sur la flore microbienne de poissons provenant d'Asie du Sud Est car il est difficile d'importer des poissons vivants ou frais.

Après prélèvement aseptique, les poissons ont été conservés dans les sacs plastiques stériles et transportés au laboratoire à proximité pour être transformés immédiatement.

Tableau II.5. : Aquarium français où ont été prélevés les échantillons de Tilapia.

N°	Société	Lieu	Aquarium	Nbre de poissons	Note
1	CIRAD	Montpellier	G	27	Échantillonnage au cours des expérimentations

II.2. Extraction de l'ADN bactérien totaux des poissons**II.2.1. Protocole d'extraction**

L'extraction de l'ADN à partir de poisson ou à partir de l'eau de la ferme aquacole est basée sur les méthodes de Ampe *et al.* (1999) et Leasing (2005) auxquelles nous avons apporté quelques modifications afin de les optimiser.

Toutes les préparations des produits utilisés pour l'extraction sont présentées dans l'annexe 1.

Trois parties du poisson ont été jugées intéressantes dans le cadre de cette étude : la peau, les ouïes et les intestins. La peau, en contact avec l'eau et les ouïes qui jouent un rôle de filtre naturel. Ils sont donc potentiellement riches en germes bactériens représentatifs de la microflore de l'eau. Par ailleurs, la microflore des intestins varie selon l'alimentation du poisson et présente donc un intérêt incontestable pour l'analyse.

Les prélèvements sont réalisés sous hotte stérile. Six grammes d'un mélange de peau (1/3), d'intestins (1/3) et d'ouïes (1/3) sont introduits dans un tube stérile contenant 6 mL d'eau peptonée tamponnée stérile. La solution est homogénéisée au Vortex (Stuart Vortex mixer, Bibby Sterilin, UK) à 2 500 rpm pendant 10 min.

Tous les échantillons, que ce soit des filets de poisson ou des écouvillons de la surface des équipements prélevés à l'usine, sont malaxés dans 10 mL d'eau peptonée pendant 10 min à vitesse maximale du Stomacher (Seward, England).

Afin d'extraire l'ADN bactérien, le filtre qui a servi à collecter les bactéries de l'eau des fermes est introduit dans un tube stérile contenant 4 mL d'eau peptonée tamponnée. La solution est homogénéisée au Vortex à 2 500 rpm pendant 10 min.

Ensuite, cette solution d'eau peptonnée est répartie en microtubes de 2 mL puis centrifugée à 12 000 g pendant 10 min (Biofuge, Heraeus Instruments, Allemagne). Les culots contenant les bactéries sont remis en suspension dans 100 µL de tampon de TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8, Promega, France).

Dans un premier temps, les cellules extraites subissent une hydrolyse enzymatique provoquée par 100 µL de lysozyme (25mg/mL, Eurobio, France) et 50 µL de protéinase K (20 mg/mL, Eurobio, France). Cette solution est agitée au Vortex pendant 1 min et incubée à 42°C au bain marie pendant 30 min, cette température correspondant à la moyenne des optimums d'activités des enzymes. Le lysozyme est une muramidase qui permet la lyse de la paroi bactérienne en coupant les liaisons β -1,4- du peptidoglycane qui relie l'acide N-acétylmuramique (NAM) à la N-acétylglucosamine (NAG). La protéinase K est une protéase non spécifique qui va permettre l'hydrolyse des protéines et notamment les protéines membranaires.

Dans un second temps, les cellules extraites subissent une dénaturation chimique par l'ajout de 20 µL de Dodecyl Sulfate de Sodium (SDS) à 20% et une incubation à 42°C pendant 10 min. Le SDS est un détergent anionique qui va favoriser la déstructuration des lipides de la membrane cellulaire. Le SDS complète l'action de la protéinase K. Après cette dénaturation protéique, 400 µL de Mixed Alkyl Trimethyl Ammonium Bromide (MATAB) à 2% dans une solution de NaCl (3M) sont ajoutés à l'hydrolysate. Le mélange est incubé à 65°C pendant 10 min. Le MATAB permet de faire précipiter les polysaccharides. De plus les ions Na^+ , qui vont se placer en périphérie de l'ADN chargé négativement, apportent une plus grande stabilité à la molécule.

Après la lyse cellulaire, la solution d'hydrolysate obtenue est purifiée par une extraction répétée 2 fois par 700 µL d'un mélange de phénol (Fluka BioChemika, Allemagne)/ chloroforme (Prolabo, France)/alcool isoamylique (Panreac, Espagne) (25/24/1, v/v/v). Le tube est agité manuellement par retournements pendant 5 min

puis centrifugé à 10 000 g pendant 10 min. Cette étape permet d'éliminer les constituants bactériens autres que les acides nucléiques. Après centrifugation, deux phases peuvent être observées dans les microtubes : la phase inférieure organique est constituée par le phénol et la phase supérieure aqueuse contient l'ADN. Les protéines et les polysaccharides sont retrouvés à l'interface des deux phases. La phase aqueuse contenant l'ADN est récupérée et traitée avec un volume d'un mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1, v/v) puis centrifugée à nouveau. Ce traitement permet d'éliminer le phénol de la solution. L'ADN est ensuite précipité par addition d'un volume d'isopropanol froid (stocké à -20°C) (Carlo Erba, France) et de 0,1 volume d'acétate de sodium 3M, pH 5,2 (Panreac, Espagne) puis les tubes sont placés à -20°C pendant une nuit. L'alcool chasse l'eau autour de la molécule d'ADN et l'acétate de sodium facilite la formation des agrégats d'ADN, créant l'apparition d'un culot d'ADN insoluble. Après une centrifugation à 10 000 g pendant 10 min, le culot d'ADN obtenu est ensuite lavé avec 500 µL d'éthanol à 70% (Prolabo, France). L'éthanol est plus volatil que l'isopropanol et permet ainsi un meilleur séchage de l'ADN. Le culot d'ADN final est séché à température ambiante. Enfin, l'ADN est repris dans 100 µL d'eau pure (Eppendorf, Allemagne) et conservé à -20°C.

II.2.2. Vérification de l'extraction d'ADN sur gel d'agarose

Avant d'amplifier les séquences cibles de l'ADN extrait, il faut en vérifier son existence et sa pureté par électrophorèse en gel d'agarose (Promega, France) à 0,8% (w/v) dans un tampon TAE 1X (Eppendorf, Allemagne).

8 µL de la solution d'ADN extrait auxquels sont ajoutés 2 µL de la solution du colorant bleu/orange (Promega, France) sont déposés dans chaque puits du gel. Le marqueur de taille moléculaire est un marqueur de 1 kb (Promega, France). La migration dure de 45 min à 1h sous une tension de 100 V.

A la fin de la migration, le gel d'agarose est immergé dans une solution de bromure d'éthidium (Promega, France) à 50 µg/mL pendant 15 min, puis rincé durant 15 min à l'eau avant d'être observé sur un trans-illuminateur UV à 318 nm. Le gel est photographié par une caméra digitale et la photo est traitée grâce au système Gel Smart 7.3 (Clara Vision, Les Ulis, France).

II.3. Amplification des ADN extraits par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

II.3.1. Amorces utilisées

La région V3 de l'ADNr 16S est amplifiée en utilisant un couple d'amorces GC 338f et 518r. Ce couple d'amorce couvre la région polymorphe V3 allant des positions 338 à 518 du gène de l'ARN 16S du ribosome de *E. coli*. (Øvreas *et al.*, 1997; Ampe *et al.*, 1999; Leasing, 2005 ; Le Nguyen *et al.*, 2008a). Pour la méthode DGGE, un GC-clamp de 40 nucléotides est ajouté à l'amorce 338f à l'extrémité 5' afin d'assurer que le fragment d'ADN demeura partiellement bicaténaire (Sheffield *et al.*, 1989) (Tableau II.6).

Tableau II.6. : Séquence des amorces GC338f et 518r utilisées en PCR.

Amorces	Position*	Séquences
GC338f (Sigma-Genosys, France)	338-357	5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG 3'
518r (Sigma-Genosys, France)	518-534	5'ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'

*Numérotation établie pour *E. coli*.

II.3.2. Préparation du mélange réactionnel de PCR

La PCR est réalisée dans une plaque de 96 puits Sorenson™ (BioScience, USA). Le mélange réactionnel est préparé comme décrit par Ampe *et al.* (1999) et Leasing (2005) (Tableau II.7).

Tableau II.7. : Composition du mélange réactionnel de PCR.

Réactifs	Volume par puits (µL)	Concentration finale dans le mix (50 µL)
dNTP 10mM par dNTP (Promega, France)	2	0,2 mM
Tampon tag, 10X (Promega, France)	5	1X
Amorce GC338f 1 µM (Promega, France)	10	0,2 µM
Amorce 518r 1 µM (Promega, France)	10	0,2 µM
MgCl ₂ 25 mM (Promega, France)	3	1,5 mM
Taq polymérase 5U/µL (Promega, France)	0,5	2,5 U
Extrait d'ADN	5	/
Eau pure (Eppendorf, Allemagne)	14,5	/

II.3.3. Condition de la PCR et appareillage

Des hybridations non spécifiques peuvent se créer lors de la réaction PCR. Ces hybridations sont dues à l'appariement de microséquences complémentaires. Pour améliorer la spécificité de l'amplification, une PCR « Touch down » est préconisée (Ampe *et al.*, 1999, Le Nguyen *et al.*, 2008a) (Tableau II.8). Une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min, puis 10 cycles de « Touch down » avec une dénaturation à 94°C pendant 1 min, une hybridation à 65°C (cette température est abaissée de 1°C par cycle jusqu'à 55°C) pendant 1 min, et une élongation à 72°C pendant 3 min. Ensuite, 20 cycles sont réalisés avec une dénaturation à 94°C pendant 1 min, une hybridation à 55°C pendant 1 min et une élongation à 72°C pendant 3 min. L'élongation finale est réalisée à 72°C pendant 10 min. Les réactions de PCR s'effectuent dans un Thermo cycler (PTC-100 Peltier Thermal Cycler, MJ Research Inc., USA).

Tableau II.8. : Conditions des réactions de PCR.

Nombre de cycles	Température (°C)	Temps (min)
1	94	5
10	94	1
	65*	1
	72	3
20	94	1
	55	1
	72	3
1	72	10

* : cette température est abaissée de 1°C par cycle jusqu'à 55°C

II.3.4. Vérification des produits PCR

Avant de réaliser la migration sur le gel de DGGE, les amplicons de PCR doivent être vérifiés par électrophorèse en gel d'agarose (Promega, France) à 2% (w/v) dans un tampon TAE 1X. La méthode est la même qu'au chapitre II.2.2.

La taille attendue des produits PCR est de 236 pb. Le marqueur de taille est un marqueur de 100 pb (Promega, France). La migration dure 30 min sous une tension de 100 V.

II.4. Électrophorèse en gel d'acrylamide avec gradient dénaturant (DGGE)

II.4.1. Composition du gel de DGGE

Les fragments d'ADNr 16S amplifiés par PCR sont analysés par DGGE dans un gel à 8% d'acrylamide/bisacrylamide (37,5/1, v/v, Promega, France) contenant un gradient de dénaturant chimique qui s'étend de 30% à 60%, constitué d'urée (Promega, France) et de formamide (Promega, France) (Tableau II.9). L'appareil de DGGE utilisé est le modèle Biorad Dcode (Biorad, USA).

Tableau II.9. : Composition des gels de DGGE pour un gradient dénaturant de 30 à 60%.

Constituants	30% de dénaturant	60% de dénaturant
40% Acrylamide/bisacrylamide	20 mL	20 mL
Formamide	12 mL	24 mL
Urée	12,6 g	25,2 g
TAE 50X	2 mL	2 mL
Eau qsp	100 mL	100 mL

II.4.2. Préparation du gel DGGE

Dans deux tubes de 50 mL d'un préparateur de gradient (Bio-Rad Model 485, USA) (Figure II.7) sont mélangés respectivement 16 mL des solutions froides (stockées à 4°C) de 30% ou 60% de dénaturants auxquels sont ajoutés 50 µL de persulfate d'ammonium (APS) (Promega, France) à 10% w/v en eau distillée et 50 µL de Tétraméthyléthylènediamine (TEMED) (Promega, France).

Le gel est coulé dans un moule de 0,75 mm d'épaisseur entre deux plaques de verre de 200 mm de côté. Une pompe Percom-I, Watson-Marlon (USA) réglée à 20 tours/min permet de transférer le gel du préparateur de gradient jusqu'au moule. La durée de polymérisation du gel est au minimum d'une heure.

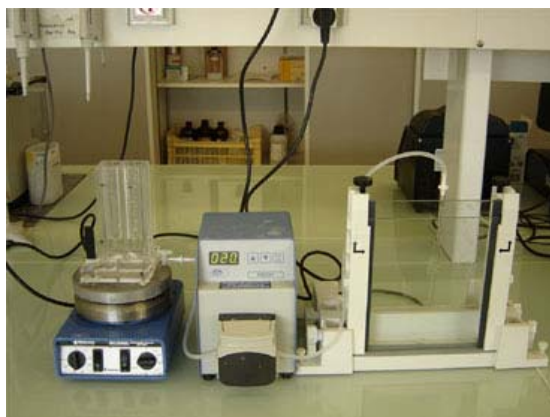


Figure II.7. : Préparation du gel de DGGE (Photo Le Nguyen, 2008) : mélangeur + pompe + sandwich des deux plaques de verre insérant le gel.

II.4.3. Conditions électrophorétiques de la DGGE

La cuve d'électrophorèse (Bio-Rad DCode System, USA) est remplie de tampon TAE 1X (Tris-acétate, EDTA pH 8,3). Elle est préchauffée préalablement pendant 1h à 1h30 avant les dépôts pour atteindre la température de migration de 60°C (Diez *et al.*, 2001).

Le gel de DGGE est placé dans la cuve préchauffée à 60°C et 3 µL de colorant bleu/orange (Promega, France) et 15 µL des produits issus de la PCR sont déposés par puits à la micropipette.

L'électrophorèse est exécutée en deux périodes successives, à 20 V pendant 10 min puis à 80 V pendant 12h. Après la migration, le gel est retiré délicatement des plaques de verre et immergé dans une solution de Bromure d'éthidium (Promega, France) à 0,5µg/mL pendant 30 min puis rincé avec de l'eau distillée (ou par du tampon TAE 1X) pendant 20 min. Le gel est ensuite observé sur le trans-illuminateur UV à 318 nm. Le gel est photographié par une caméra digitale et traité grâce au system Gel Smart 7.3 (Clara Vision, Les Ulis, France).

II.4.4. Traitement d'image et traitement statistique des profils DGGE

L'image qui est visualisée sur l'écran d'ordinateur est enregistrée sous format .tif en négatif (bandes d'ADN noires sur fond clair).

Les fichiers des gels sont ensuite traités par le logiciel ImageQuantTL® version 2003 (Amersham Biosciences, USA).

Afin d'étalonner nos gels, nous avons utilisé 2 produits d'amplification d'ADN de souches pures de bactéries, soit une souche d'*E. coli* isolée des poissons-chats *Pangasius* du Vietnam et une souche de *Lactobacillus plantarum* A6 isolé du manioc roui au Congo. *E. coli* est une bactérie à Gram négatif et *L. plantarum* est une bactérie à Gram positif. Ces 2 témoins permettent de vérifier le bon déroulement de la DGGE et servent de témoin de position pour situer les différentes bandes obtenues des échantillons lors de la comparaison des profils bactériens d'un gel à l'autre.

La différence entre les témoins (*Escherichia coli* et *Lactobacillus plantarum*) est calculée et appelée DTe. Ensuite on prend comme référence la bande de *Lactobacillus plantarum*, et pour chaque bande X on calcule la différence entre la bande (X) et la bande de *Lactobacillus plantarum* que l'on appelle d (Figure II.8).

La position relative (PR) de chaque bande est calculée selon la formule :

$$PR(X) = \frac{d}{DT_e}$$

Ainsi, chaque bande d'ADN est caractérisée par sa position relative.

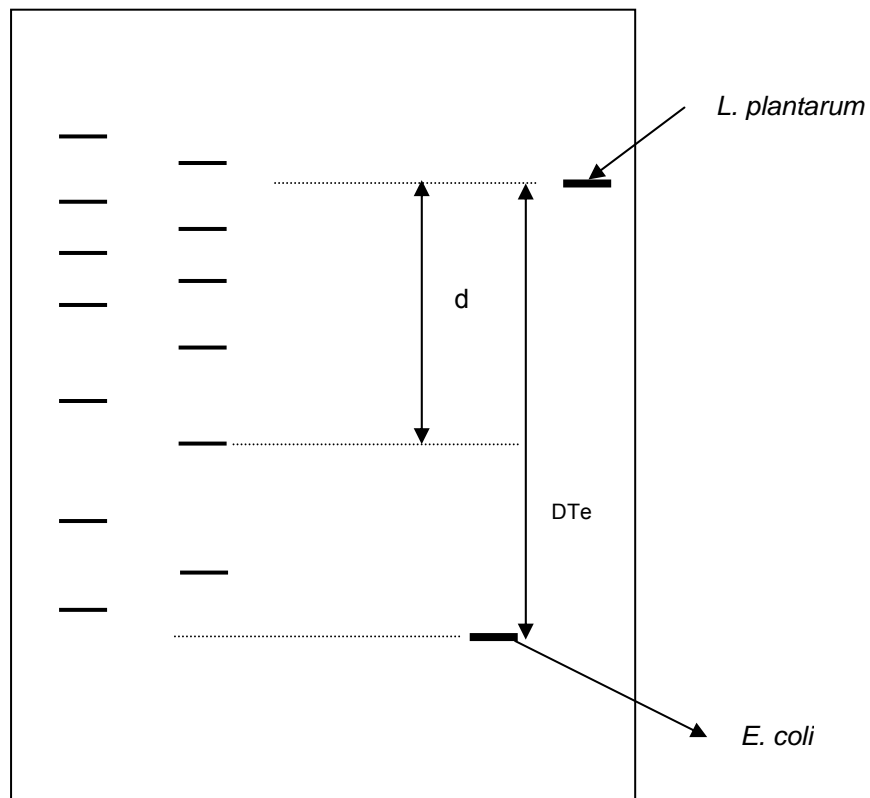


Figure II.8. : Exploitation d'un gel DGGE.

Les profils DGGE diffèrent par le nombre, la position ou l'intensité des bandes pour chaque piste correspondant aux dépôts de produit de PCR obtenu à partir d'un extrait d'ADN. Il est possible pour chaque piste de coder la présence ou l'absence d'une bande à une position particulière par 1 (présence) ou 0 (absence) et de construire une matrice binaire à partir de laquelle un dendrogramme de distances est calculé (Schäfer et Muyzer, 2001 ; Fromin *et al.*, 2002).

Le coefficient de similarité de Dice a été utilisé (Heyndrickx *et al.*, 1996) selon la formule :

$$S_{Dice} = 2 N_{AB} / (N_A + N_B)$$

Où :

N_{AB} représente le nombre de bandes communes aux échantillons (profils),

N_A et N_B : représentent le nombre de bandes dans les échantillons A et B, respectivement.

Une fois la matrice des distances calculée, la méthode statistique UPGMA (Unweighed Pair-Wise Grouping With Mathematical Averages) est utilisée pour tracer un dendrogramme qui illustre la classification des profils.

La méthode UPGMA est une méthode d'analyse des données binaires, qui permet la construction de dendrogrammes et qui dépeint les distances en forme graphique, basées sur le degré de "dissimilarité" entre profils DGGE. Ce qui permet une classification numérique des échantillons en utilisant le coefficient de similarité de Dice (Kowalchuk *et al.*, 1997 ; Lebaron *et al.*, 1999 ; Gelsomino *et al.*, 1999 ; Griffiths *et al.*, 2000 ; Ibekwe *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces analyses a été réalisé en utilisant le logiciel Statistica version 7.1 (StatSoft, France).

II.4.5. Séquençage des fragments d'ADN à partir des bandes DGGE

Les bandes visibles sur le gel de DGGE sont découpées à partir du gel avec un scalpel stérile. L'ADN de chaque bande est ensuite élué dans 100µL du tampon TE à 4°C durant la nuit. 100µL de l'ADN élué à partir de chaque bande a été purifié grâce au kit Wizard PCR Preps DNA Purification system (Promega, France) (Annexe 3) puis a été ré-amplifié dans les mêmes conditions mais en utilisant dans ce cas des amorces sans GC-clamp et ensuite envoyé pour leur séquençage chez GATC Biotech (Allemagne). L'efficacité de cette procédure a été vérifiée par l'électrophorèse des amplicons de PCR obtenus sur gel DGGE. Pour les bandes de même position sur le gel DGGE pour des pistes différentes, une seule bande représentative a été purifiée puis réamplifiée avec l'amorce sans GC clamp. Cependant, quelques bandes issues de la même position ont été séquencées afin de vérifier si elles n'étaient pas issues de la même espèce. Les séquences d'ADNr 16S obtenues ont été comparées à celles de la banque de données disponibles sur le site de GenBank de NCBI (National Center for Biotechnology Information databases) grâce au programme BLAST afin de déterminer les séquences connues les plus proches.

La comparaison des séquences des souches obtenues a été réalisée en utilisant le logiciel ClustalW2 (logiciel disponible en ligne sur le site de l'EMBL-EBI)

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>.

II.5. Étude de la variabilité de la position des bandes et de la répétabilité des gels DGGE

L'objectif est d'étudier la répétabilité, la fiabilité et la robustesse de la PCR-DGGE. On voudrait observer la variabilité de la position d'une bande répétée sur plusieurs puits dans un même gel ainsi que la variabilité de position d'un gel à un autre. L'extraction d'ADN a été réalisée 3 fois séparément sur un bar de l'aquarium E de l'Ifremer de Palavas (sud de Montpellier) (Tableau II.1). Trois PCR séparées ont été réalisées sur les 3 extraits d'ADN des bactéries d'un seul poisson puis chaque produit de PCR est déposé 5 fois sur le même gel pour réaliser 15 dépôts pour chacun des 3 gels DGGE différents, c'est-à-dire 45 dépôts au total.

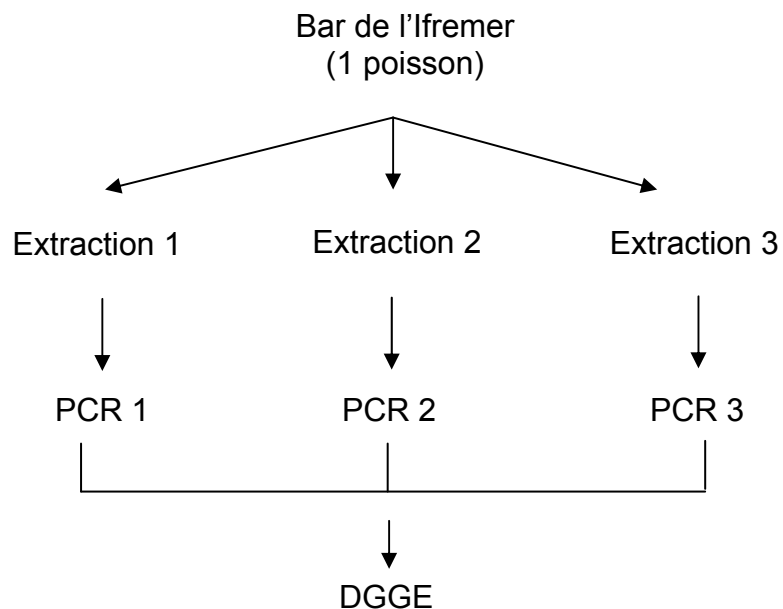


Figure II.9. : Plan expérimental pour étudier la variabilité de la position des bandes et de la répétabilité des gels de DGGE.

Après la migration en DGGE, toutes les bandes ont été identifiées, le ratio de migration a été calculé par rapport aux témoins (produits PCR de l'ADN de *Lactobacillus plantarum* et *E. coli*) afin de définir une position relative de chacune des bandes.

La répétabilité est étudiée en comparant les moyennes des positions relatives des 5 bandes des 3*5 produits analysés au moyen d'un test de comparaison de moyenne (Test de la plus petite différence significative de Fischer) grâce au logiciel Statistica version 7.1 (Statsoft, France).

II.6. Étude de la pérennité des profils DGGE bactériens

II.6.1. Analyse de bars du même lieu mais issus d'aquariums différents

Nous avons travaillé avec des bars provenant de 2 aquariums différents de l'Ifremer Palavas, Montpellier. Les deux aquariums possèdent des circuits d'eau très différents. L'aquarium ASC possède un circuit fermé, il est alimenté par de l'eau de mer qui est filtrée et recyclée en continu. C'est un système fermé comme les aquariums d'une ferme piscicole. Par contre, l'aquarium C1 possède un circuit ouvert ; l'eau est pompée dans la mer au même endroit que l'aquarium ASC, et donc renouvelée en permanence. C'est un système ouvert assimilable à ce qui se passe en mer (Tableau II.1).

Cinq poissons différents par localisation ont été analysés. De plus, pour vérifier la répétabilité et la fiabilité de cette méthode, 3 extractions différentes et 3 amplifications différentes ont été réalisées avec un seul bar de l'aquarium ASC. Tous les amplicons PCR sont ensuite analysés par la DGGE.

II.6.2. Effet des traitements technologiques sur les profils bactériens du poisson

II.6.2.1. Effet des traitements de filetage, de marinage, de séchage et de réfrigération

Les objectifs sont d'étudier l'impact de la méthode de conservation (réfrigération) et de la transformation (filetage, séchage, marinage) sur l'expression qualitative de la flore bactérienne des filets du poisson.

L'expérience a été réalisée dans des conditions simulées de deux procédés industriels que sont le marinage et le séchage des poissons.

Nous avons réalisé cette expérience avec des tilapias du CIRAD, Montpellier (Tableau II.5.).

Chaque poisson est débité en 2 filets identifiés Fb et Fa. Un filet est traité (Fa), l'autre sert de référence (Fb). Afin de mesurer l'évolution des flores bactériennes du poisson avant et après l'étape de filetage, le poisson est fileté soit sous condition stérile (sous hotte stérile, scalpel stérile) soit fileté sous conditions propres simulant les conditions de l'usine de transformation (Figure II.10.). Nous sommes toutefois conscients que les conditions expérimentales ne sont pas tout à fait équivalentes à ce qui se passe à l'intérieur de l'usine car les contaminations par les bactéries du lieu de travail en condition réelle sont dues à la fois à l'environnement mais aussi aux

manipulateurs du poisson. Cette expérimentation permettra cependant de bien appréhender l'effet des traitements humains et de l'environnement sur la flore microbienne présente sur les filets lors des traitements appliqués.

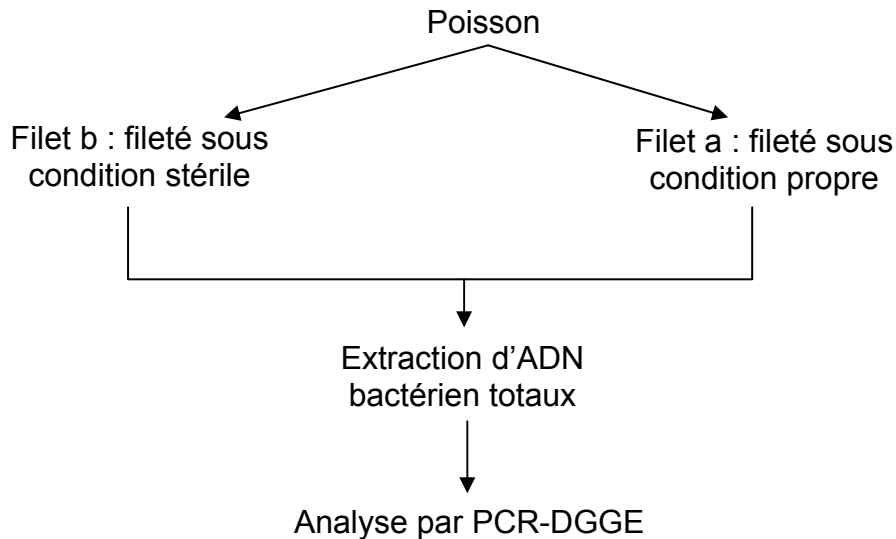


Figure II.10. : Plan expérimental pour mesurer l'évolution bactérienne avant et après le filetage.

Le marinage a été réalisé dans un bocal hermétique contenant 100 mL de solution de marinage pour 10g de poisson. La solution de marinage est préparée avec de l'acide acétique (60 g/L) (Gazechim, S.A, France) et du sel (50 g/L) (La Baleine, Salin du midi, France). Chaque filet est trempé dans cette solution pendant 1 h et agité manuellement toutes les dix minutes (Figure II.11). Le pH final du filet de poisson est déterminé avec un pH mètre (Bioblock Scientific, UK) sur cinq grammes de filet de poisson broyés dans 50 mL d'eau distillée pendant 2 min. Pour le séchage, le filet a été coupé en morceaux (2x1cm) et mis dans une étuve à 120°C pendant 3 h (Figure II.11). La teneur en eau finale des filets est déterminée par séchage dans une étuve à 105°C jusqu'à poids constant. Pour la réfrigération, le filet a été conservé dans un réfrigérateur à 4°C pendant 2 semaines. (Figure II.11).

Après les traitements, tous les filets de poissons ont été conservés en chambre froide à -20°C jusqu'à l'extraction d'ADN. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque traitement.

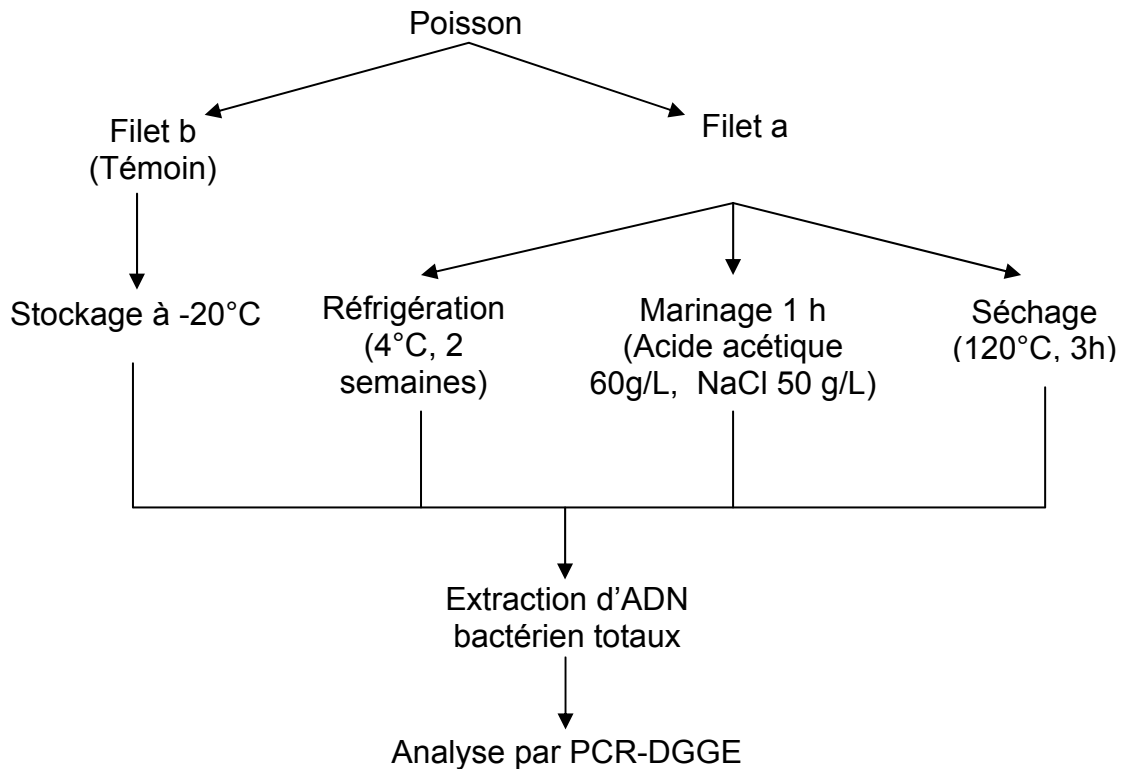


Figure II.11. : Plan expérimental présentant les effets des traitements de marinage, de séchage et de réfrigération sur les marqueurs bactériens.

II.6.2.2. Effet des répétitions de cycles de congélation-décongélation

L'étude des répétitions de cycles a pour but de vérifier la persistance des bactéries chez les poissons lors des congélations et décongelations successives, événements qui peuvent survenir lors de la rupture de la chaîne du froid pendant le transport. Les nombres de cycles appliqués sont de 1, 5, 10 ou 15.

Nous avons réalisé cette expérience avec des tilapias du CIRAD, Montpellier (Tableau II.5).

Chaque poisson est débité en 2 filets identifiés Fb et Fa. Un filet est traité (Fa), l'autre sert de référence (Fb). Le filetage a été réalisé dans des conditions sanitaires très propres équivalentes aux conditions industrielles. Les filets sont placés à l'intérieur de sacs de polyéthylène stérile et scellés à la chaleur. Chaque sachet est bien identifié (noms, dates). Un filet témoin possède un thermocouple chargé de suivre et d'enregistrer la température à cœur lors de la congélation et la décongélation.

Pour suivre les paramètres de traitement, la mesure des températures selon des intervalles de temps programmables est réalisée grâce à une centrale

d'acquisition de température multiports (ALMEMO 22-8, France), équipée de thermocouples de type T (cuivre-constantan, de diamètre 1/10^{ème} de mm). La taille et la flexibilité des thermocouples permettent d'instrumenter finement les filets de poissons pour acquérir en cours de congélation et de décongélation la température à cœur.

Une heure avant le début de l'opération, l'enceinte de surgélation (Facis, France) à air pulsé utilisée est mise en marche et la température de consigne fixée à -50°C afin que la température soit stable au moment de l'introduction des échantillons. Les filets sont congelés en 30 min.

La décongélation est réalisée par douchage continu (eau à 20°C environ) des filets emballés jusqu'à ce que la température à cœur du témoin soit positive (environ 15 min). Cette pratique n'est pas forcément la plus hygiénique mais est la plus largement répandue dans l'industrie de transformation des produits de la mer. Après le traitement, tous les filets de poissons ont été conservés en chambre froide à -20°C jusqu'à l'extraction d'ADN. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque traitement (Figure II.12).

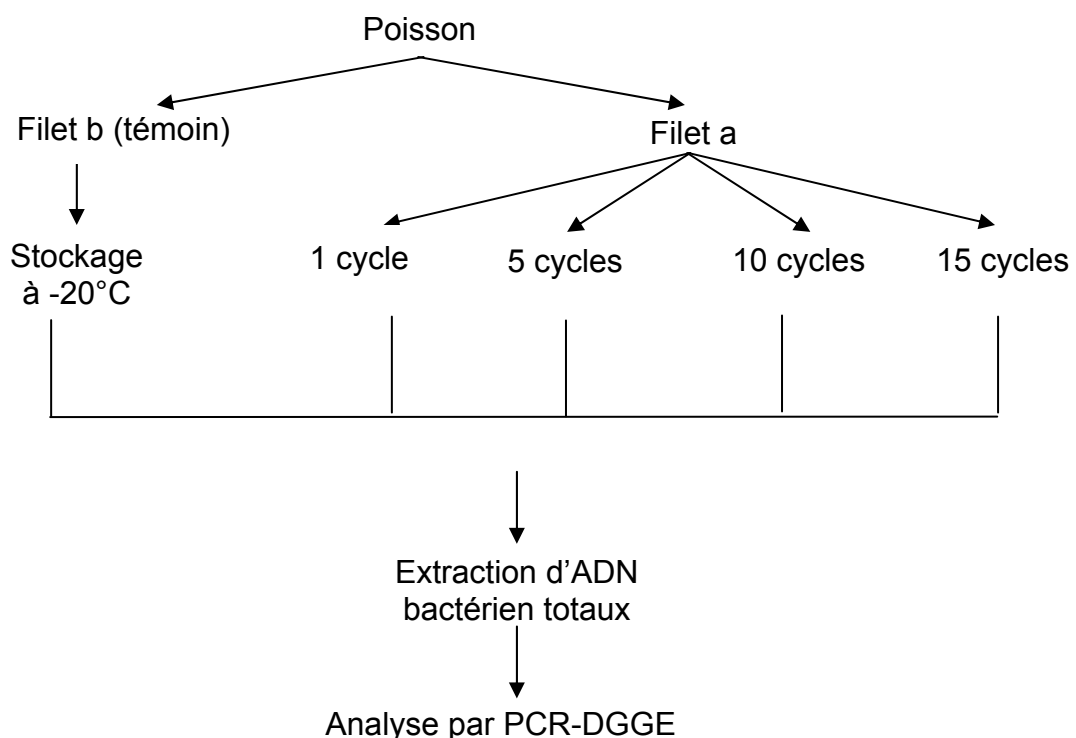


Figure II.12. : Plan expérimental pour mesurer l'effet des répétitions des cycles de congélation-décongélation sur les profils microbiens des poissons.

L'étude de l'effet de la congélation a pour but de vérifier la stabilité des profils microbiens au cours de la congélation, une technique souvent utilisée pour l'exportation des poissons.

Nous avons réalisé cette expérience avec des tilapias du CIRAD, Montpellier (Tableau II.5).

Chaque poisson est débité en 2 filets identifiés Fb et Fa. Le filet Fb a subi immédiatement une extraction d'ADN bactérien total. Le filet Fa est conservé dans une chambre froide à -20°C pendant 3 semaines puis subi une extraction d'ADN bactérien total. Une analyse de PCR-DGGE a ensuite été réalisée pour comparer les profils microbiens des filets Fa et du filet témoin Fb (Figure III.13). Trois répétitions ont été réalisées.

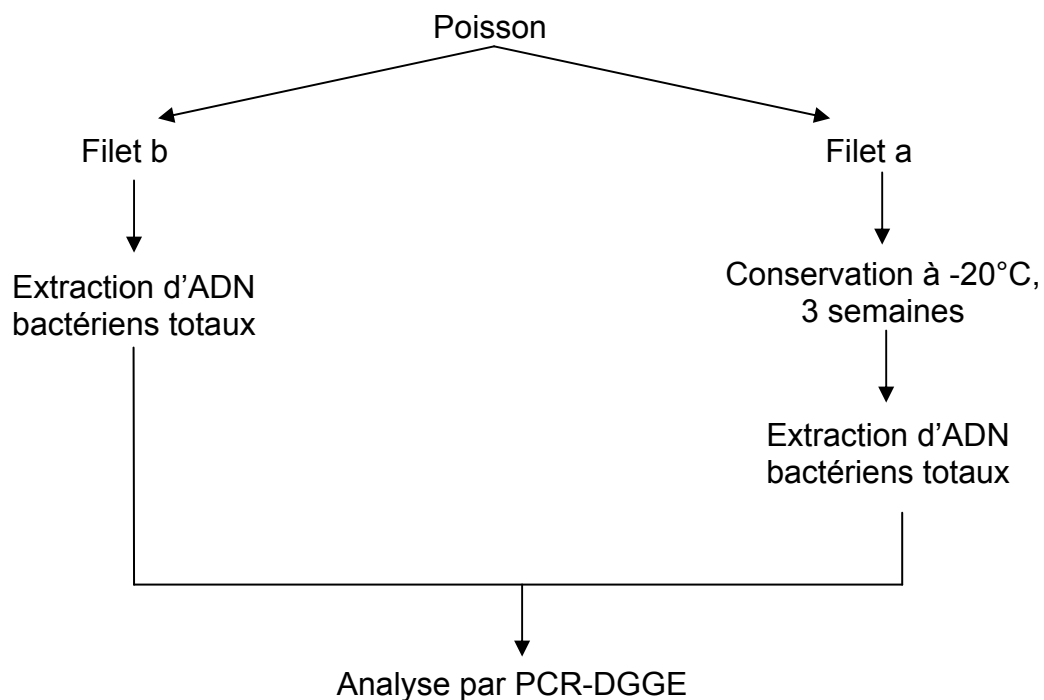


Figure II.13. : Plan expérimental pour mesurer l'effet de la congélation sur les profils microbiens des poissons.

II.7. Études sur la diversité des *Pseudomonas* au Vietnam

Dans l'étude précédente sur les profils microbiens obtenus à partir des filets de poissons-chats *Pangasius* et à la surface des équipements de transformation dans l'usine vietnamienne, nous avons noté que les *Pseudomonas* étaient résistants aux traitements et pouvaient persister sur les produits finis et à la surface des

matériaux. Dans ce contexte, pour mieux appréhender ces bactéries, nous avons réalisé une étude sur la diversité des *Pseudomonas* au Vietnam.

II.7.1. Prélèvement des Pseudomonas à partir de l'environnement et des Pangasius

Les souches bactériennes utilisées lors de cette étude sont des souches isolées de l'eau, de la boue du bassin d'élevage et des *Pangasius* provenant de différentes fermes des trois districts de la région d'An Giang au Vietnam : An Phu (AP) ; Chau Phu (CP), Chau Doc (CP).

II.7.2. Isolement et purification des Pseudomonas

L'isolement et la purification des souches de *Pseudomonas* ont été réalisés en utilisant les étapes suivantes : pré-enrichissement en bouillon non sélectif, culture sur gélose spécifique d'isolement des *Pseudomonas* (DifcoTM), purification sur le même milieu, coloration de Gram, test oxydase et test catalase. Au total, 25 souches ont été isolées directement à partir des poissons, plus 2 souches de *Pseudomonas* isolées des filets de *Pangasius* de l'usine.

Après une incubation de 48 h à 30°C, les souches purifiées sont conservées sur le même milieu en gélose en pente à 4°C ou dans un cryotube contenant du bouillon glycérolé à -20°C.

Les milieux de culture utilisés sont décrits dans l'annexe 2.

Coloration de Gram

La coloration de Gram a été réalisée sur un frottis séché et fixé à l'alcool et à la chaleur en utilisant un kit de réactif "Color Gram2-E" (BioMérieux, France).

Étude de la mobilité

La mobilité est étudiée sur une gélose de mobilité en culotensemencée en piqure centrale et incubée pendant 24h à 37°C. Les bactéries non mobiles ne formeront qu'une seule ligne de croissance qui ne déviara pas du point original de l'inoculation. Les bactéries mobiles formeront une zone diffuse de croissance autour de la ligne d'inoculation.

Test de l'oxydase

La recherche de l'oxydase a été réalisée en laissant tomber 1 à 2 gouttes de réactif « Oxydase reagent 55635 » (BioMérieux, France) à la surface d'un disque non imprégné de diamètre de 6 mm. Une colonie de la souche à tester, issue d'une culture de 48 h sur une gélose nutritive, est mise en contact avec le disque via une pipette Pasteur. L'apparition en 10 à 30 sec d'une coloration allant de violet à pourpre indique un test positif. Des réactions tardives ou l'absence de couleur indiquent un test négatif.

Test de la catalase

La catalase est mise en évidence en suspendant dans le réactif ID color catalase ID-ASE (BioMérieux, France) une colonie à tester avec une pipette Pasteur. Un dégagement d'oxygène sous forme de mousse ou de bulles témoigne de l'activité de la catalase.

Conservation des souches bactériennes

Les souches bactériennes pures isolées ont été conservées pour des manipulations ultérieures en utilisant deux méthodes :

Conservation à 4°C sur gélose nutritive inclinée (NA)

Une colonie bien isolée cultivée sur gélose nutritive est ensemencée par strie sur une gélose nutritive en pente et mise en culture 48 h à 30°C. Les souches sont conservées à 4°C après avoir observé la croissance et la pureté des cultures. Les souches peuvent être conservées pendant 6 mois dans ces conditions.

Conservation par congélation dans du glycérol à 15% (v/v)

Après la croissance des bactéries sur le milieu bouillon nutritif (NB) pendant 48 h à 30°C, 1 mL de culture est mis dans un cryotube (Nalgenne®cryoware™, USA) auquel est ajouté 1 mL de glycérol (Merck, Allemagne) à 30% préalablement stérilisé (15 min à 121°C) afin d'obtenir une concentration finale de 15%. Les cryotubes sont conservés dans un congélateur à -20°C. Les souches peuvent être conservées dans ces conditions pendant plusieurs années. Lors de la remise en culture des souches conservées, une portion du contenu d'un cryotube est remise dans du bouillon du milieu NB (bouillon nutritif) et le tube est mis à incuber à 30°C

pendant 24 h. Ceci est suivi par une culture pendant 48 h sur une boîte de Pétri de gélose nutritive (NA).

II.7.3. Rep-PCR (Repetitive element sequence-based polymerase chain reaction)

Dans les conditions d'isolement que nous avons appliqué, il est possible qu'une même souche soit présente plusieurs fois dans la collection. Avant d'entreprendre l'identification fine des souches par séquençage du gène de l'ARN 16S du ribosome, il a semblé important d'éliminer les doublons de la collection et de différencier les souches entre elles. La méthode choisie est la Rep-PCR. La Rep-PCR est une méthode souvent utilisée pour identifier le génotype des bactéries, dans laquelle des éléments répétitifs particuliers, présents dans le génome de la bactérie, sont amplifiés par une réaction spécifique de PCR.

Généralement, l'amplification par PCR nécessite une étape d'extraction et de purification de l'ADN mais Versalovic *et al.* (1994), Lows *et al.* (1998) et Randemaker *et al.* (1998) ont montré qu'il est possible de réaliser l'extraction de l'ADN et l'amplification par PCR dans le même milieu réactionnel. De ce fait, cette méthodologie a considérablement simplifié les protocoles en permettant l'analyse de plusieurs souches en parallèle en une seule étape.

II.7.3.1. Amorce utilisée et conditions de la Rep-PCR

Les séquences répétitives BOX du génome bactérien sont amplifiées en utilisant l'amorce BOX (Versalovic *et al.*, 1994) (Tableau II.10).

Tableau II.10. : Séquences de l'amorce BOX utilisée.

Amorce	Séquence
Box A 1 R (Sigma Genosys, France)	5' CTA CGG CAA GGC ACG CTG ACG 3'

La PCR est réalisée sur une plaque de 96 puits Sorenson™ (BioScience, USA). Le mélange réactionnel est préparé comme décrit par Randemaker *et al.* (1998) (Tableau II.11 et Tableau II.12).

Tableau II.11. : Composition du mélange réactionnel de la REP-PCR
(volume final 25 µL).

Réactifs	Volume (µL)
Tampon Gitschier 5X	5
BSA 20 mg/mL (Promega, France)	0,2
DMSO 100% (Fluka, Suisse)	2,5
dNTP 25 mM par dNTP (GE Healthcare, UK)	1,25
Amorce BOX A1 R (Sigma Genosys, France)	1
Taq polymérase, 5 U/µL (Promega, France)	0,4
Souche bactérienne repiquée 24 h	Une öse de 1 µL calibrée (Legallais, France)
Eau ultrapure qsp (Eppendorf, Allemagne)	14,65

Tableau II.12. : Composition du tampon de Gitschier 5X
(volume final 200 mL).

Réactifs	Volume (mL)
(NH ₄) ₂ SO ₄ 1M (Sigma-Aldrich, Allemagne)	16,6
Tris-HCl 1M pH 8,8 (Promega, France)	67
MgCl ₂ 1M (Merck, Allemagne)	6,7
1 :100 dilution d'EDTA 0,5 M (Promega, France)	1,3
β- mercapto-éthanol (Sigma-Aldrich, Allemagne)	2,08
Eau ultra pure (Eppendorf, Allemagne)	106,32

Cette solution est stérilisée pendant 15 min à 121°C, puis conservée en aliquote dans un microtube de 1 mL à -20°C.

Les conditions des cycles de PCR ont été déterminées par Wood *et al.* (1993) et Rademaker et De Bruijn (1997) pour les cellules bactériennes entières (Tableau II.12). Le mélange réactionnel est tout d'abord chauffé à 80°C pendant 15 min. Ensuite, une dénaturation initiale à 95°C pendant 2 min est suivie de 35 cycles avec une dénaturation à 92°C pendant 30 sec, une hybridation à 50°C pendant 1 min, et une élongation à 65°C pendant 8 min. L'élongation finale est réalisée à 65°C pendant 8 min. Les réactions de PCR s'effectuent dans un Thermo cycler (PTC-100 Peltier Thermal Cycler, MJ Research Inc., USA).

Tableau II.13. : Conditions des réactions de la Rep-PCR.

Nombre de cycles	Température (°C)	Temps (min)
1	80	15
1	95	2
35	92	0,5
	50	1
	65	8
1	65	8

II.7.3.2. Électrophorèse en gel d'agarose

Les produits de PCR ont été vérifiés par électrophorèse en gel d'agarose (Promega, France) à 1,5% (w/v) dans un tampon TAE 0,5X.

1,2 µL de la solution de colorant bleu/orange (Promega, France) et 6 µL du produit PCR sont déposés dans chaque puits. Le marqueur de taille de 1 kb (Promega, France) est placé dans le premier et le dernier puits. La migration dure de 1,5h à 2h sous une tension de 50 V.

A la fin de la migration, le gel d'agarose est immergé dans une solution de bromure d'éthidium (Promega, France) à 50 µg/mL pendant 30 min, puis rincé durant 15 min à l'eau avant d'être observé sur un trans-illuminateur UV à 318 nm. Le gel est photographié par une caméra digitale puis la photo est traitée grâce au system Gel Smart 7.3 (Clara Vision, Les Ulis, France).

II.7.3.3. Traitement statistique des profils obtenus sur gel d'agarose

Les amplicons de taille variable sont séparés par taille dans le gel d'agarose pour donner des profils électrophorétiques différents entre des souches d'espèces différentes et également pour des souches de la même espèce. Les photos des profils de la Rep-PCR ont été analysées avec le logiciel GelCompar (version 4.0, Applied Maths, Kortrijk, Belgique). Ce logiciel détecte et identifie d'abord toutes les bandes visibles sur chaque gel. Tous les gels sont normalisés en utilisant le marqueur de taille 1kb (Promega, France). Chaque bande est repérée par la taille des fragments auxquels elle correspond. La présence des bandes sur chaque gel est ensuite enregistrée sous la forme d'une matrice binaire tenant compte de l'absence (0) ou de la présence (1) des bandes aux positions enregistrées (Heyndrickx *et al.*, 1996).

L'analyse des données de la matrice binaire est réalisée par la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group with Mathematical Averages) avec le coefficient Dice comme décrit précédemment.

II.7.4. Identification des *Pseudomonas* par biologie moléculaire

Les souches de *Pseudomonas* isolées ont pu être classées par analyse statistique en 7 grands groupes. Dans chaque groupe, 2 ou 3 souches ont été choisies pour être identifiées par séquençage. Nous avons donc sélectionné au total 16 souches pour leur séquençage.

II.7.4.1. Extraction d'ADN à partir des souches isolées

Une colonie issue de la culture d'une souche pure revivifiée, cultivée sur une gélose d'isolement des *Pseudomonas* (Difco™) est récoltée avec une öse stérile (Legallais, France) et transvasée dans un microtube de 2 mL contenant 100 µL de TE. Ensuite l'ADN de la souche est extrait en suivant le même protocole que décrit précédemment.

II.7.4.2. Amplification des ADN extraits par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La séquence partielle de l'ADNr 16S est amplifiée en utilisant un couple d'amorces MM3 et P13 (Tableau II.14). Ce couple d'amorce amplifie un fragment de 995 pb (position 371 à 1370 du ARNr 16S de *E. coli*), (Ferroni *et al.*, 2003).

Tableau II.14. : Séquence des amorces MM3 et P13 utilisées en PCR.

Amorces	Position*	Séquences
MM3 (Sigma-Genosys, France)	371	5'- GCA GCA GTG GGG AAT TTT GG
P13 (Sigma-Genosys, France)	1370	5'- AGG CCC GGG AAC GTA TTC AC

*Numérotation établie pour *E.coli*

Le mélange réactionnel est préparé comme décrit par Ferroni *et al.* (2003) (Tableau II.15).

Tableau II.15. : Composition du mélange réactionnel de PCR (volume final 100 µL).

Réactifs	Volume par puits (µL)	Concentration finale dans le mix (100 µL)
dNTP 10mM par dNTP (Promega, France)	4	0,2 mM
Tampon tag, 10X (Promega, France)	10	1X
Amorce MM3 1 µM (Promega, France)	20	0,2 µM
Amorce P13 1 µM (Promega, France)	20	0,2 µM
MgCl ₂ 25 mM (Promega, France)	6	1,5 mM
Taq polymerase 5U/µL (Promega, France)	1	5U
Extrait d'ADN bactérien	5	/
Eau pure (Eppendorf, Allemagne)	34	/

Les conditions des cycles de PCR ont été déterminées par Ferroni *et al.* (2003) (Tableau II.16). L'amplification a été réalisée dans un thermocycler (PTC-100 Peltier Thermal Cycler, MJ Research Inc., USA) avec 40 cycles : une dénaturation à 94°C pendant 20 sec, l'hybridation à 55°C pendant 1 min et une élongation à 72°C pendant 45 sec. L'élongation finale est réalisée à 72°C pendant 10 min.

Tableau II.16. : Conditions des réactions de PCR.

Nombre de cycles	Température (°C)	Temps (sec)
40	94	20
	55	20
	72	45
1	72	600

II.7.4.3. Purification et séquençage des produits PCR

Les produits de PCR ont été vérifiés sur gel d'agarose QA TM (Q-Biogene, USA) à 1% (w/v) dans un tampon TAE 1X. La bande qui correspond à 995 pb a été coupée à partir du gel avec un scalpel stérile. L'amplicon de PCR a été purifié avec un kit Wizard PCR Preps DNA Purification system (Promega, France) (Annexe 3) puis envoyé pour son séquençage chez GATC Biotech (Allemagne). Les séquences d'ADNr 16S obtenues ont été comparées avec la banque de données du site du NCBI (National Center for Biotechnology Information databases) grâce au programme BLAST afin de déterminer les séquences connues les plus proches.

La comparaison des séquences des souches obtenues a été réalisée en utilisant le logiciel ClustalW2 (logiciel disponible en ligne sur le site de l'EMBL-EBI)

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1 Étude de la répétabilité de la méthode

La répétabilité et la reproductibilité sont deux caractéristiques de la fidélité d'une méthode d'analyse. Dans le contexte de cette étude, seules les conditions de vérification de la répétabilité étaient réunies à savoir un même opérateur, utilisant la même technique d'analyse.

Les résultats de DGGE des ADN bactériens extraits d'un bar de l'aquarium E, IFREMER Palavas (Montpellier) sont présentés dans la figure III.1. Soit les photos de trois gels de DGGE. Sur chaque gel sont analysés les produits de trois PCR de trois extraits d'ADN obtenus indépendamment d'un même poisson. Chaque produit de PCR est déposé 5 fois sur le même gel. En plus de cela, les produits de la PCR d'ADN extrait des deux souches témoins (*Lactobacillus plantarum* et *Escherichia coli*) sont déposés sur chaque gel.

On peut observer que les ADN des souches témoins ont donné des bandes intenses et uniques situées en haute du gel pour la souche de *Lactobacillus plantarum* et en bas du gel pour la souche d'*Escherichia coli*, soit comme attendu, respectivement dans les zones de faibles (49%) et de haut (53%) GC%.

Concernant les résultats obtenus avec les ADN extraits du poisson, on observe 5 bandes intenses et bien séparées. L'hypothèse à l'origine de ce travail est que ce qui caractérise l'origine d'un poisson, c'est la présence d'une souche bactérienne et sa combinaison avec d'autres souches et non le niveau de population de telle ou telle souche. Le succès de cette approche est en relation directe avec la capacité de donner l'image la plus fidèle des souches bactériennes présentes dans les échantillons. C'est ce que permet en théorie la PCR-DGGE telle que nous la réalisons et qui conduit à un profil électrophorétique pouvant être considéré comme une image de l'ensemble des souches bactériennes présentes dans les échantillons analysés. Chaque bande discrète et individuelle se rapporte à un unique phylotype (souche ou clone) (Muyzer *et al.*, 1993 ; Van Hannen *et al.*, 1999). Il est donc essentiel que l'ADN des différentes souches bactériennes soient extraits avec le meilleur rendement possible. Cependant l'étape d'amplification par PCR qui est conduite sur un mélange de séquences cibles et de concentrations différentes fait que compte tenu des lois cinétiques, une souche bactérienne plus abondante voit son amplification conduire à d'avantage de produits de PCR et donc a une bande

plus intense. Dans ces conditions, la concentration seuil de visualisation des souches bactériennes varie en fonction de l'importance de sa population et aussi de celles des autres souches. Il est important de réaffirmer que la clé de l'analyse et l'utilisation des profils de PCR-DGGE est la position de chacune des bandes sur le gel par rapport à la position du dépôt, soit la distance de migration.

Cette distance peut varier d'un gel à un autre pour de multiples causes :

- La qualité du gel dont la fabrication n'est pas normalisée,
- la qualité du courant électrique appliqué,
- la régulation de la température de la cuve,
- les paramètres de prise de vue et d'impression qui modifient les dimensions du gel.

Dans ces conditions, nous avons choisi d'utiliser deux souches témoins dont les amplicons uniques migrent différemment et de calculer pour chaque bande la valeur de sa position relative. Ainsi la position de chaque bande est caractérisée par la valeur du ratio égal à la distance entre la bande analysée et celle de la bande de la souche du *Lactobacillus plantarum* sur la valeur de la distance entre les deux bandes des souches témoins. La répétabilité est étudiée en comparant les moyennes des positions relatives des 5 bandes des 3*5 produits analysés au moyen d'un test de comparaison de moyenne (Test de la plus petite différence significative de Fischer).

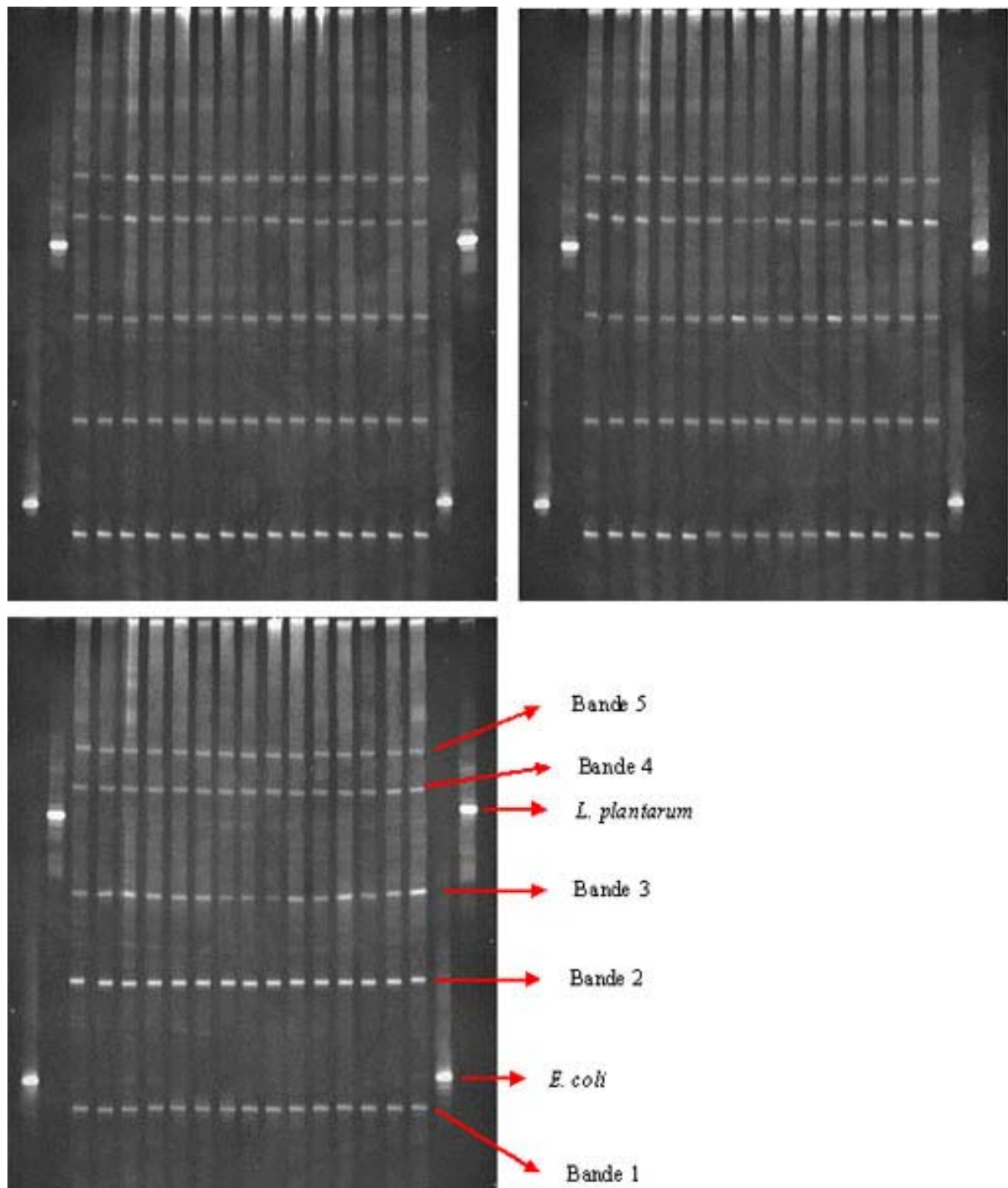


Figure III.1. : Photo de 3 gels indépendants de DGGE d'ADN bactériens extraits d'un bar élevé à IFRMER Palavas (Hérault/France), et amplifiés lors de 3 PCR indépendantes. Chaque produit de PCR est déposé 5 fois.

Tableau III.1. : Valeur de la moyenne et de l'intervalle de confiance (IC) des distances relatives de migration de toutes les bandes DGGE pour 5 bandes distinctes présentes sur 3 gels de DGGE indépendants.

		Gel 1	Gel 2	Gel 3
Bande 1	moyenne	1,128 ^a	1,121 ^a	1,119 ^a
	IC	0,13%	0,11%	0,14%
Bande 2	moyenne	0,676 ^a	0,674 ^a	0,681 ^a
	IC	0,11%	0,13%	0,15%
Bande 3	moyenne	0,293 ^a	0,291 ^a	0,301 ^a
	IC	0,25%	0,30%	0,90%
Bande 4	moyenne	0,121 ^a	0,117 ^a	0,123 ^a
	IC	0,18%	0,35%	0,45%
Bande 5	moyenne	0,224 ^a	0,227 ^a	0,235 ^a
	IC	0,15%	0,20%	0,28%

IC au risque 5% calculé sur les 3*5 répétitions de chaque bande sur chaque gel

^a : les petites lettres indiquent l'appartenance des moyennes par ligne à des groupes homogènes (Test LSD au risque 5%).

Les résultats obtenus présentent une certaine variabilité de la valeur des distances relatives de migration avec des valeurs de l'intervalle de confiance pouvant aller jusqu'à 0,9% au risque 5%. Malgré cela, les valeurs moyennes observées pour une même bande appartiennent toutes au même groupe homogène. On pourra donc considérer que les bandes dont la valeur de la distance relative s'écarte de 0,9% sont différentes.

III. 2. Application de la PCR-DGGE sur des poissons d'origines géographiques différentes

Cette étude a pour objectif d'évaluer la capacité de la PCR-DGGE à différencier des poissons d'origines géographiques différentes.

III.2.1. Analyse de bars élevés dans trois régions différentes

Les échantillons analysés sont des poissons de la même espèce mais élevés dans le même pays, soit dans des régions différentes, soit dans des aquariums différents.

Les échantillons de poissons utilisés lors de cette étude sont des bars qui viennent de fermes aquacoles de différentes régions et de milieux aquatiques différents :

- Établissement de l'Ifremer Palavas (Montpellier), aquarium K : Mer méditerranée.
- Société « Les bars du soleil » (Sète) : Mer méditerranée.
- Société Aquanord (Gravelines) : Mer du Nord.
- Société du Viviers du Gois (Beauvoir sur Mer) : Océan Atlantique.

Pour chaque poisson, une extraction des ADN totaux a été réalisée suivie d'une amplification par PCR.

Sur le gel de vérification de l'extraction des ADN (Figure III.2), des bandes intenses et nettes sont observées dans les zones de hauts poids moléculaires, avec des bandes moins intenses dans les zones de faibles poids moléculaires. La position des bandes de hauts poids moléculaires correspond à celles de fragments de plus de 10 kb qui sont sans doute de l'ADN génomique microbien combiné à de l'ADN génomique de poisson. L'aspect des bandes obtenues rend compte d'une quantité suffisante d'ADN extrait qui permet de réaliser une amplification par PCR. Ceci démontre l'efficacité de la méthode optimisée au laboratoire pour l'extraction directe des ADN bactériens à partir du poisson.

Le témoin négatif a été réalisé par extraction d'ADN par du tampon TE. L'absence d'ADN sur le témoin négatif montre bien qu'il n'y a pas de contamination de tous les réactifs utilisés pour l'extraction.

La purification est une étape importante et rendue difficile parce que les matrices (poisson) contiennent des lipides, des protéines, des polysaccharides et des sels qui diminuent les rendements d'extraction et peuvent être retrouvés mélangés aux extraits d'ADN (Wilson, 1997). Ces résidus pourraient également agir comme inhibiteurs lors de l'amplification par PCR.

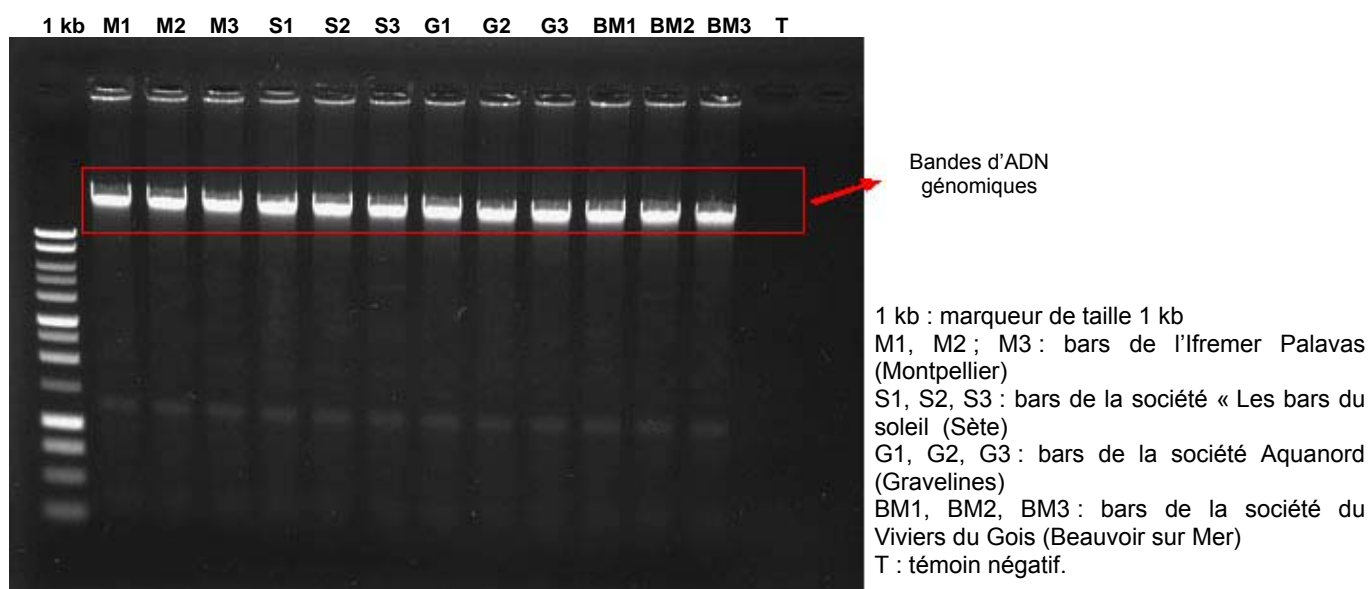


Figure III.2. : Photo de gel d'agarose à 0,8% de vérification de l'efficacité de l'extraction d'ADN bactériens extraits de bars de différentes origines géographiques.

Le résultat de l'amplification par PCR par les amorces GC 338f et 518r de l'ADN microbien extrait des poissons est visible sur la figure III.3. Sur le gel d'agarose, les produits de PCR donnent des bandes uniques, nettes et intenses situées entre 298 pb et 220 pb, ce qui correspond à la taille attendue qui est de 236 pb. Le témoin négatif a été réalisé avec le mélange réactionnel sans ajout d'ADN extrait. L'absence de bande pour le témoin négatif montre qu'il n'y a pas de contamination du mélange réactionnel de PCR.

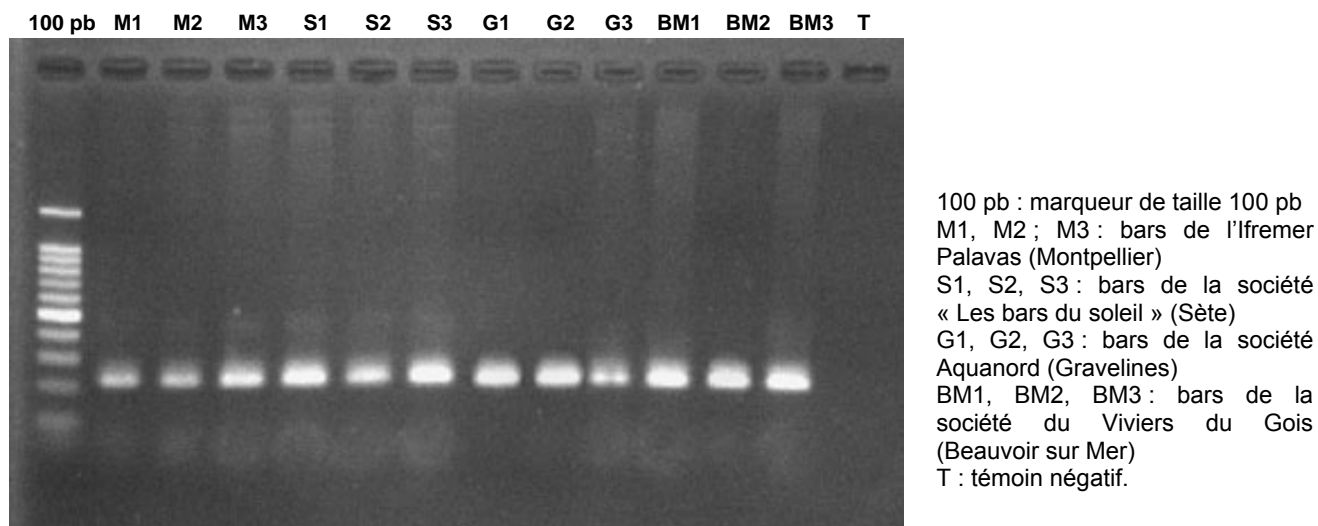


Figure III.3. : Photo de gel d'agarose à 2% de vérification de l'amplification d'ADN bactériens extraits de bars de différentes origines géographiques.

Les résultats obtenus montrent que la qualité et la quantité des ADN totaux extraits des bactéries des poissons sont bonnes et qu'aucun inhibiteur ne semble avoir une influence sur la réaction d'amplification. Les produits de PCR réalisés avec les ADN bactériens extraits des poissons sont analysés par DGGE. Les résultats de cette électrophorèse sont montrés dans la figure III.4.

Sur le gel, on peut observer que les ADN extraits des deux souches témoins ont donné des bandes intenses et uniques situées aux positions attendues, ce qui montrent le bon déroulement de la DGGE.

Sur le gel, on peut observer de 4 à 6 bandes intenses et distinctes pour chaque dépôt. Le profil DGGE des poissons d'un même aquarium est identique et se différencie des profils obtenus avec les poissons d'origine différente par le nombre et la position des bandes. Malgré le nombre restreint de bandes observées, l'analyse statistique (Figure III.5) des profils DGGE montre que les profils obtenus avec les poissons de la même origine se regroupent dans un cluster unique avec

100% de similarité. Les profils de bars élevés en mer Méditerranée (Montpellier et Palavas) se regroupent dans un grand cluster avec 88% de similarité. Les profils de bars élevés dans la Mer du Nord (Gravelines) et l'océan Atlantique (Beauvoir sur Mer) se regroupent aussi dans un grand cluster avec 82% de similarité. A l'intérieur de ces deux groupes, les profils des poissons d'origines différentes sont bien différenciés. Enfin, les profils des bars de Méditerranée et ceux des autres origines se distinguent clairement avec seulement 70% de similarité.

Les poissons analysés sont issus d'élevages aquacoles, à l'exception de ceux de Palavas qui sont élevés en aquarium, qui sont en relation directe avec le milieu sauvage avec 3 environnements vraiment différents comme la salinité, la température, la qualité des eaux mais aussi par les pratiques d'élevage en particulier l'alimentation qui peut varier d'une entreprise à l'autre. Il n'est donc pas surprenant de trouver cette différenciation des profils, à savoir une certaine similarité entre les profils méditerranéens d'une part et ceux de l'océan et de la mer du nord d'autre part car des études sur les flores microbiennes aquatiques sur des poissons capturés dans divers endroits géographiques ont montré qu'elles étaient étroitement associées au statut physiologique des poissons, à leur qualité hygiénique et aux conditions d'élevage (Okpokwasili et Alpapiki, 1990 ; Grisez *et al.*, 1997 ; Spanggaard *et al.*, 2000; Leasing, 2005). Les microflore bactériennes aquatiques sont à la surface des poissons et dans leurs intestins (Sugita *et al.*, 1985). Des études ont montré que les flores intestinales reflètent les flores de l'environnement aquatique, et en particulier de celle de l'alimentation (Campbell et Buswell, 1983 ; Nieto *et al.* 1984).

Les profils des poissons capturés dans le même enclos sont rigoureusement identiques. Cela rejoint les observations de Al-Harbi et Uddin (2005) qui ont caractérisé la flore bactérienne intestinale des Tilapias élevés dans 3 étangs différents. Dans chacun des étangs, la population bactérienne des poissons était étroitement similaire.

A la vue de ces résultats, on peut aussi s'interroger du faible nombre de bandes observées dans chacun des profils car l'obtention de profils avec un petit nombre de bandes témoigne soit de la faible diversité microbienne dans le milieu, soit de l'incapacité de la méthode à mettre en évidence l'essentiel des souches bactériennes présentes dans les échantillons. Nous pensons qu'il s'agit plutôt ici de l'expression de l'appauvrissement de la diversité liée aux conditions d'élevage car le

protocole utilisé pour nos analyses en PCR DGGE est celui optimisé par Leasing en 2005 qui permet d'explorer au mieux la diversité bactérienne.

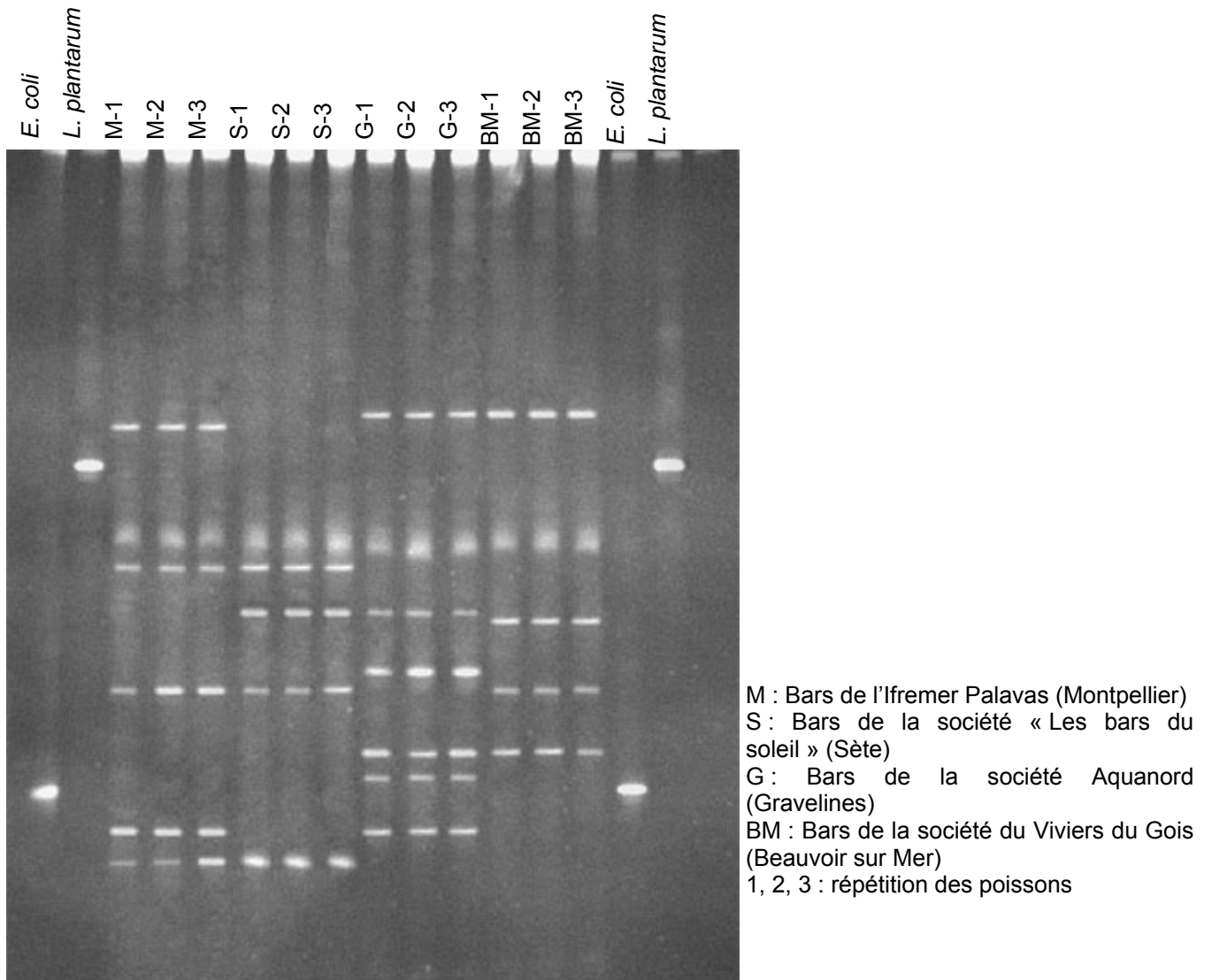


Figure III.4. : Photo du gel de DGGE d'ADN bactériens extraits de bars de différentes origines géographiques.

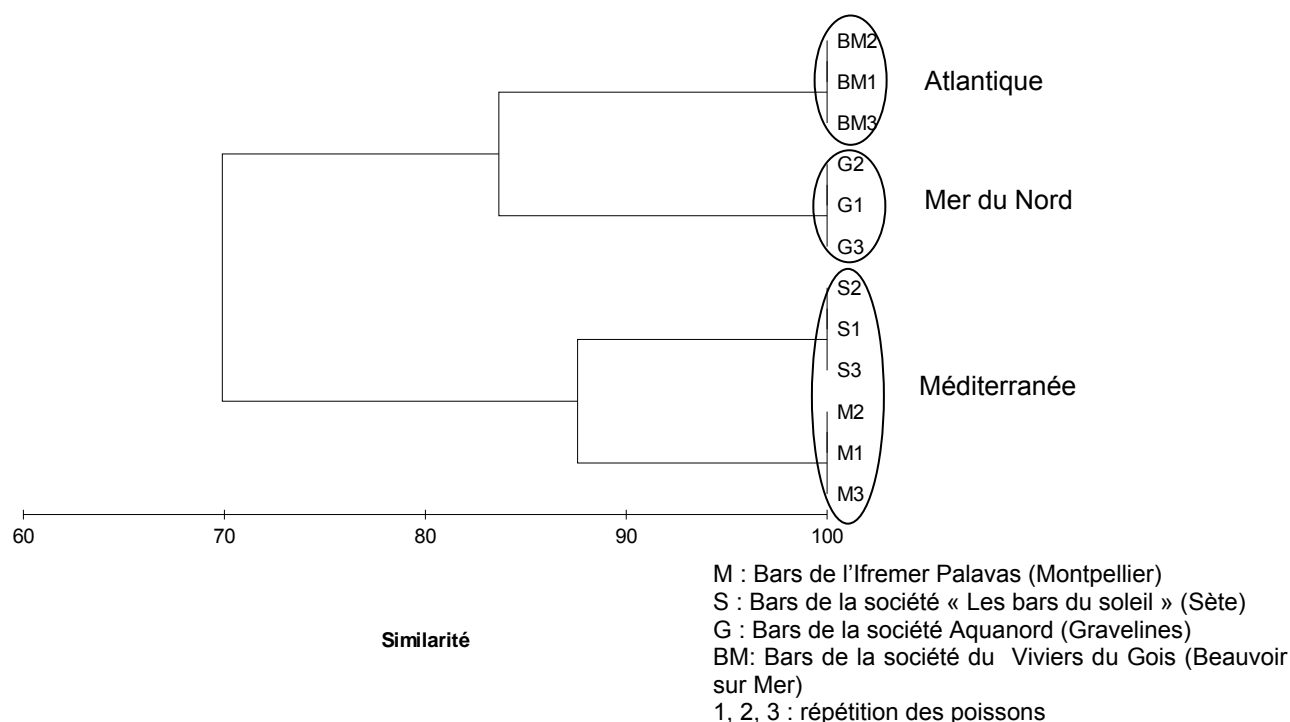
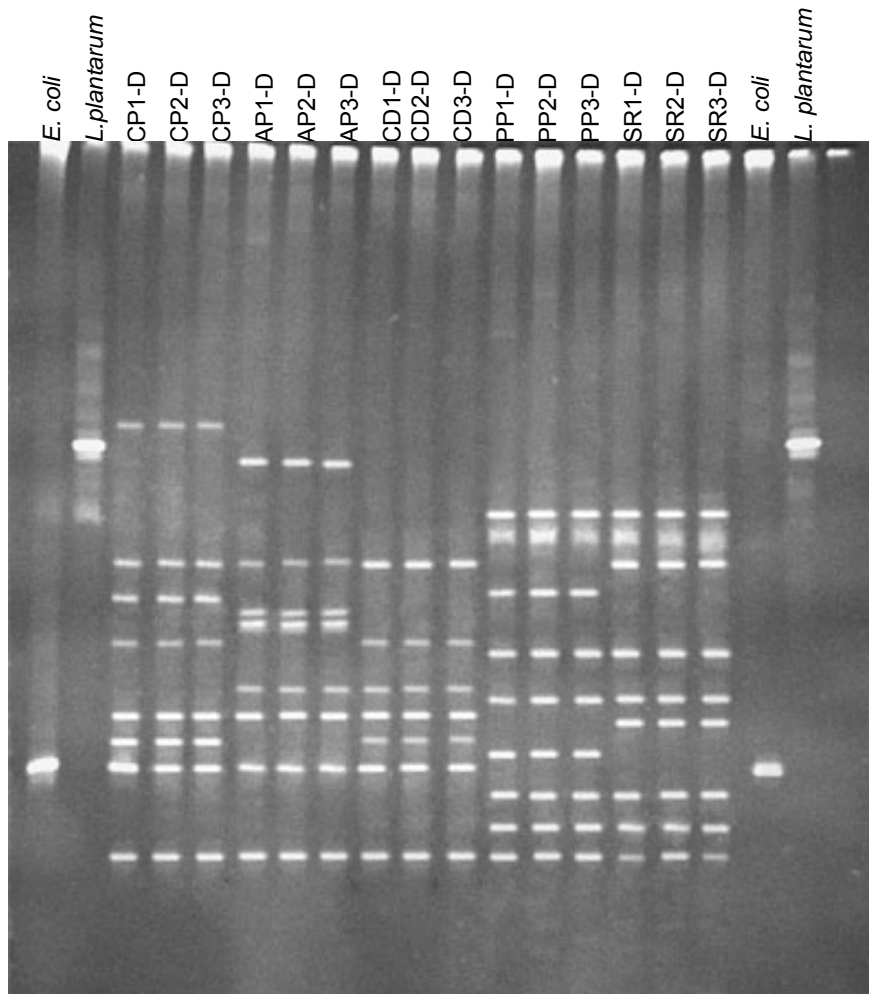


Figure III.5. : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN bactériens extraits de bars de différentes origines géographiques.

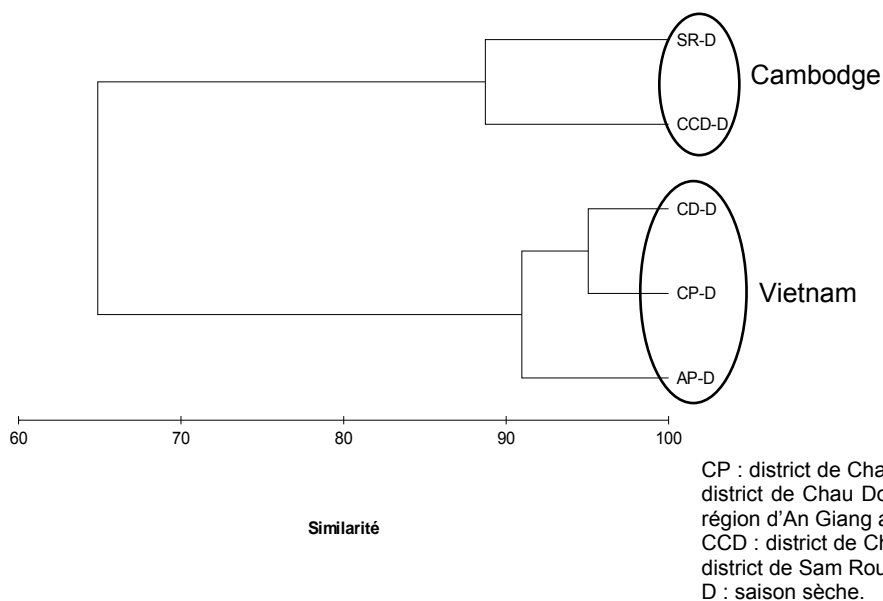
III.2.2 Analyse de *Pangasius* du Vietnam et du Cambodge

L'échantillonnage a été réalisé au mois de février et mars 2006, lors de la saison sèche au Cambodge (Mars) qui est également la saison sèche dans le delta du Mékong au Vietnam (Février). Trois poissons différents par localisation ont été analysés. Soit sur 9 poissons du Vietnam et 6 du Cambodge. Sur le gel de DGGE, on observe des bandes nettes et bien distinctes (Figure III.6). Le nombre des bandes des profils de DGGE dans chaque piste varie de 7 à 8 bandes pour les *Pangasius* du Vietnam et est de 9 bandes pour ceux du Cambodge. L'observation du gel de DGGE permet de dire que les profils de DGGE d'ADN bactérien extrait des poissons d'un même étang sont très similaires tant par la position des bandes que par leur intensité. Les profils de DGGE des poissons du Vietnam sont très différents de ceux du Cambodge. L'analyse statistique (Figure III.7) confirme nos observations, à savoir que les poissons du même pays se regroupent dans un même cluster avec 90% pour les poissons du Vietnam et 88% pour ceux du Cambodge. Les poissons originaires des deux pays sont différenciés, ils appartiennent à deux clusters différents (65% de similarité).



CP : district de Chau Phu ; AP : district d'An Phu ; CD : district de Chau Doc ; CP : district de Chau Phu de la région d'An Giang au Vietnam
 CCD : district de Chamcar Daung (Phnom Penh) ; SR : district de Sam Rong (Siem Reap) au Cambodge
 1, 2, 3 : répétition des poissons
 D : saison sèche

Figure III.6. : Photo du gel DGGE d'ADN bactérien extrait de *Pangasius* du Vietnam et du Cambodge.



CP : district de Chau Phu ; AP : district d'An Phu ; CD : district de Chau Doc ; CP : district de Chau Phu de la région d'An Giang au Vietnam
 CCD : district de Chamcar Daung (Phnom Penh) ; SR : district de Sam Rong (Siem Reap) au Cambodge
 D : saison sèche.

Figure III.7. : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN bactériens extraits de *Pangasius* du Vietnam et du Cambodge.

Les poissons du Vietnam qui proviennent de districts différents de la même région d'An Giang sont bien discriminés par leurs profils bactériens. L'effet « origine » des fermes est bien visible bien que les lieux de capture soient distants seulement de quelques Km sur le cours du Mékong et que l'alimentation des poissons est différente. L'effet « origine » des deux pays est bien visible, avec 35% de discrimination, entre le Cambodge et le Vietnam dont les fermes sont distantes d'environ 200Km. A notre connaissance, les éleveurs cambodgiens utilisent souvent des aliments artisanaux comme le son de riz, les poissons fourrages (petits poissons d'eau douce) et le soja. Par contre, les éleveurs vietnamiens utilisent souvent des granulés industriels à base de farines animales et végétales dont il est difficile de connaître la composition (Figure III.8).



Figure III.8. : Emballage vietnamien d'aliments pour poisson.

III.2.3 Analyse des *Pangasius* de différents districts de la même région d'An Giang au Vietnam

Nous avons montré que la PCR-DGGE permettait de différencier des poissons élevés dans des zones géographiques relativement éloignées. Nous avons voulu savoir si cette différenciation était possible pour des poissons élevés dans des zones géographiques rapprochées. Les poissons utilisés pour cette étude, ont été élevés dans 5 étangs différents de 5 différents districts de la même région d'An Giang dans le delta du Mékong au Vietnam.

L'échantillonnage a été réalisé au mois d'octobre 2005, c'est-à-dire pendant la saison des pluies au Vietnam. Cinq poissons différents par localisation ont été analysés.

Sur les gels DGGE, des bandes nettes et bien distinctes sont observées (Figure III.9). Le nombre des bandes des profils DGGE des poissons des étangs

différents varie de 8 à 10 bandes. L'observation des gels DGGE permet de dire que des profils DGGE d'ADN bactériens extraits des poissons d'un même étang sont très similaires tant par la position des bandes que par leur intensité. Les poissons des étangs différents ont des profils DGGE différents.

L'analyse statistique des profils DGGE des poissons montre une similarité importante entre les différentes localisations de la même région où les poissons ont été collectés (Figure III.10). A 92% de similarité, 2 principaux clusters sont observés : le premier cluster contient des échantillons des districts de Chau Phu et Chau Doc ; le deuxième cluster contient les échantillons des districts d'An Phu, Tan Chau et Phu Tan. La communauté bactérienne des districts de Chau Doc et Chau Phu est étroitement liée avec 95% de similarité, ainsi que la communauté bactérienne des districts d'An Phu, Tan Chau et Phu Tan avec 93% de similarité.

L'analyse de similarité a montré une similarité de 92% pour toutes les fermes des districts de la même région d'An Giang. On peut dire qu'il existe un profil type des bactéries pour cette région. Ce profil peut servir d'identité pour cette région lors de la comparaison avec des autres régions.

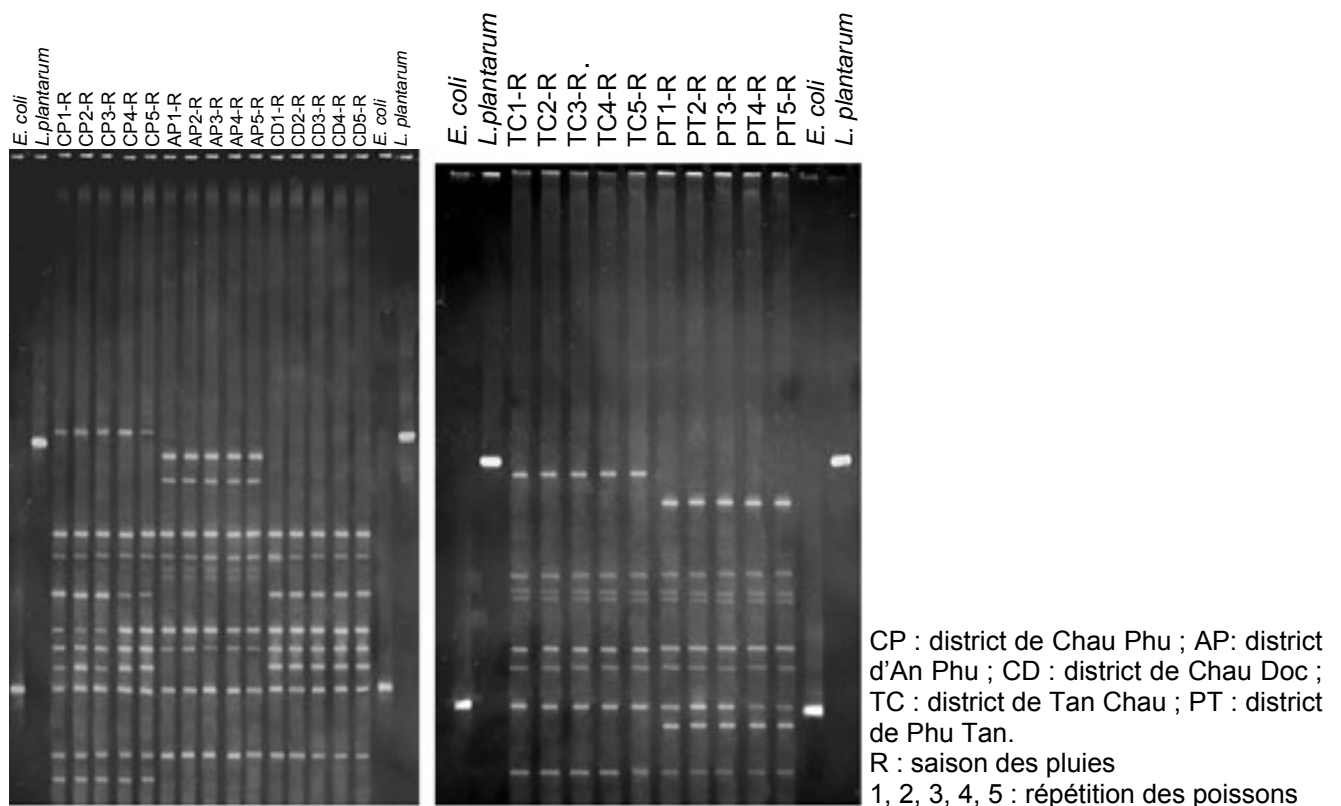


Figure III.9. : Photo des gels de DGGE d'ADN bactériens extraits de *Pangasius* capturés dans 5 districts différents de la région d'An Giang

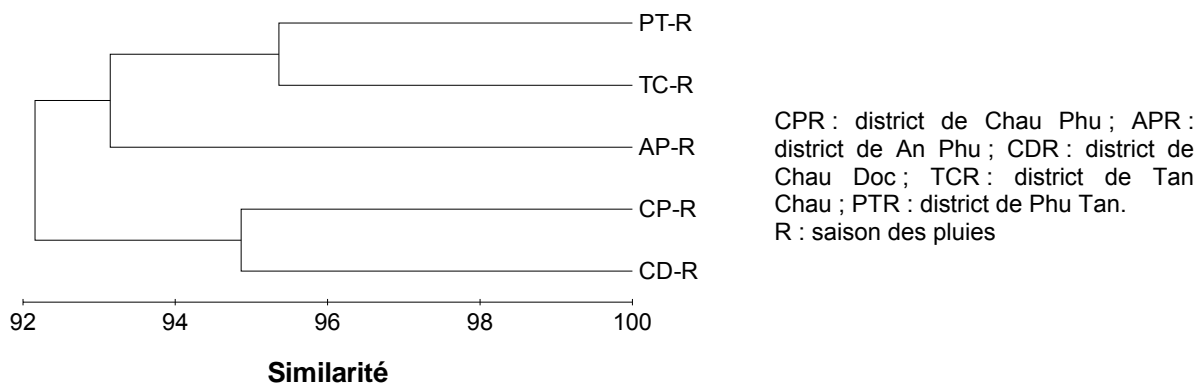


Figure III.10. : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN bactérien extraits de *Pangasius* capturés dans 5 districts différents de la région d'An Giang.

La différence entre les profils d'un étang à l'autre peut être due aux aliments et aux types de pratiques aquacoles mais aussi à l'environnement de l'étang qui est modifié par les activités des villageois, comme le rejet des eaux usées dans les fleuves. A titre d'exemple, Gonzalez *et al.* (2001) ont trouvé une différence importante de prédominance des souches d'*Aeromonas* mésophiles dans la flore des poissons d'eau douce provenant de rivières urbaines soumises à la pollution humaine par rapport aux mêmes poissons élevés en aquaculture contrôlée dans la même région.

De plus, les antibiotiques sont utilisés de façon abusive pour traiter les maladies des poissons au Vietnam, alors même que cela ajoute un surcoût de 5% au coût total de l'élevage. Il est cependant difficile de mesurer l'impact de cette pratique sur le développement des résistances aux antibiotiques chez les bactéries. Les travaux de Sarter *et al.* (2007) ont montré que cette pratique était sans nul doute liée à l'émergence de souches multi résistantes pathogènes susceptibles de poser des problèmes en santé humaine. D'autant plus qu'en raison de la diminution de l'efficacité thérapeutique des antibiotiques peu coûteux tel que l'oxytétracycline, durant la dernière décennie, beaucoup d'aquaculteurs asiatiques ont utilisé d'autres antibiotiques à larges spectres tels que le chloramphénicol et les dérivés du florfenicol. Bien que l'utilisation de ces antibiotiques en aquaculture ait récemment été interdite dans un certain nombre de pays asiatiques, ses résidus ont été détectés dans des produits exportés vers le marché européen. En addition au problème des résidus, la création d'antibiorésistance chez la flore microbienne aquacole peut contribuer à la modification voir à la dégradation de la biodiversité

bactérienne dans les élevages et éventuellement à l'émergence de maladies humaines difficilement curables.

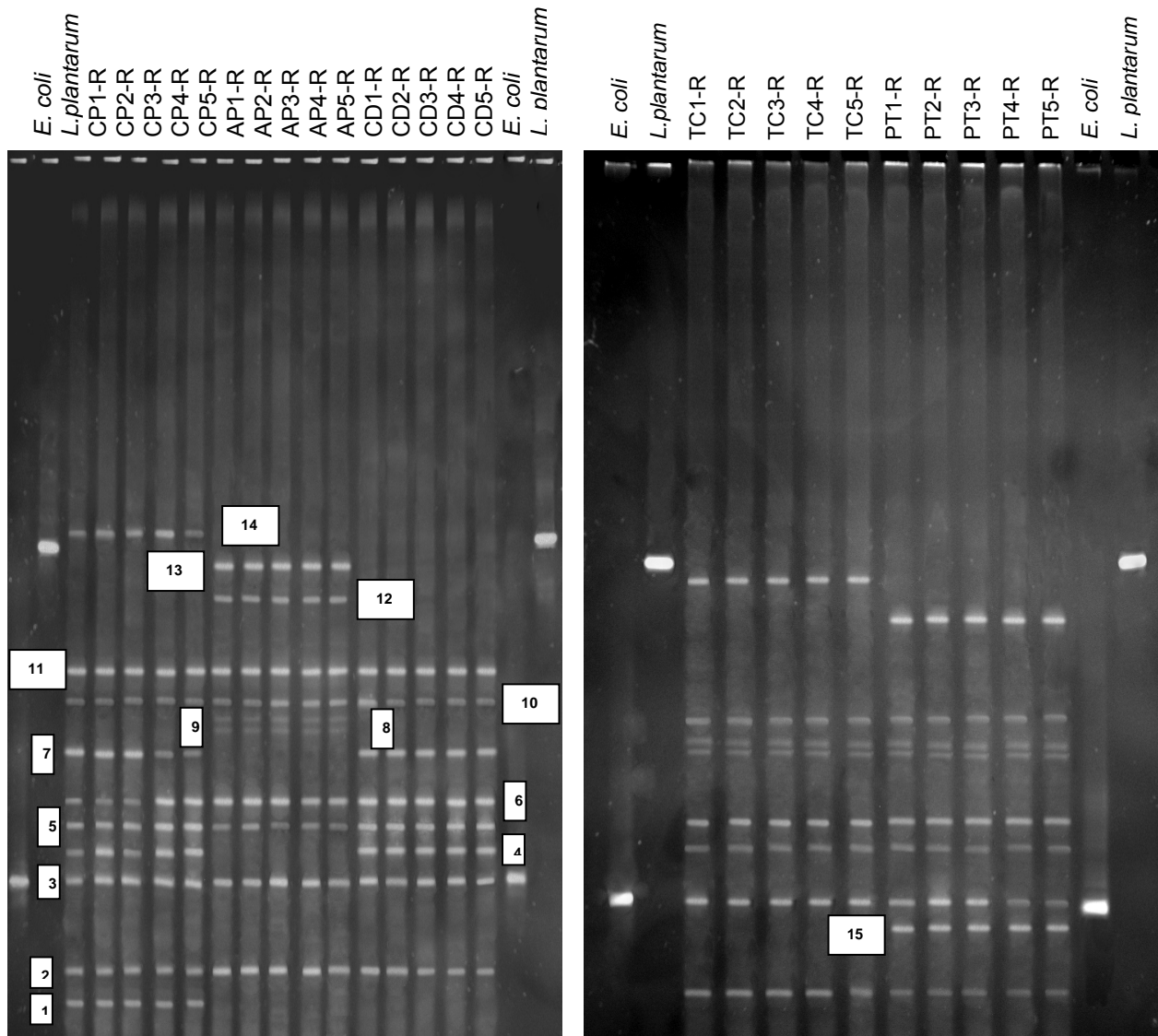
Les aliments préparés artisanalement sont encore utilisés dans quelques fermes vietnamiennes, mais ils sont de plus en plus remplacés par des granulés industriels. Ils peuvent influencer la diversité de la population bactérienne des poissons élevés. Parmi les 5 fermes étudiées, seule la ferme du district de Phu Tan utilise encore les aliments artisanaux. Les 4 autres fermes utilisent des aliments industriels. Avec les aliments, certains éleveurs ajoutent des additifs à faible concentration afin d'améliorer la santé et la croissance des poissons (Le *et al.*, 2006). Ces additifs contiennent des vitamines, des minéraux, de la lysine, méthionine et des probiotiques qui peuvent réagir sur la diversité bactérienne de l'environnement ainsi que sur les flores microbiennes des poissons.

En fait, en regardant les différentes localisations de prélèvements d'échantillons sur la carte de la région d'An giang (Figure II.2 dans la partie Matériels et Méthodes), le Mékong se sépare en 2 principaux bras. Le district de Chau Phu et Chau Doc sont sur le même bras à l'ouest et les districts d'An Phu, Tan Chau et Phu Tan sont sur un autre bras à l'est du Mékong. On peut conclure qu'il y a suffisamment de différences de qualité de l'eau et d'environnement d'élevage pour influencer l'écologie microbienne.

III.2.4. Identification par séquençage des bactéries dominantes sur les poissons *Pangasius* du Vietnam

Les bandes extraites du gel sur les profils DGGE d'ADN bactérien extrait de poissons *Pangasius* du Vietnam (Figure III.11) ont été séquencées pour connaître l'identité des souches bactériennes présentes dans les échantillons de poissons.

Toutes les bandes bien distinctes sont séquencées après réamplification avec le même couple d'amorces, sans le GC clamp, pour donner des amplicons d'environ 179 paires de bases. Pour les bandes de même position dans le gel DGGE, on ne séquence qu'une bande représentative. Cependant, quelques bandes de la même position ont été aussi séquencées, et les résultats montrent que ce sont des souches identiques.



CP : district de Chau Phu ; AP : district d'An Phu ; CD : district de Chau Doc ; TC : district de Tan Chau ; PT : district de Phu Tan.

Les numéros dans les cadres indiquent les numéros de bandes séquencés correspondant à la figure III.12.

Figure III.11. : Séquençage des bandes DGGE d'ADN bactérien extrait des poissons-chats *Pangasius* issues de 5 districts différents de la région d'An giang.

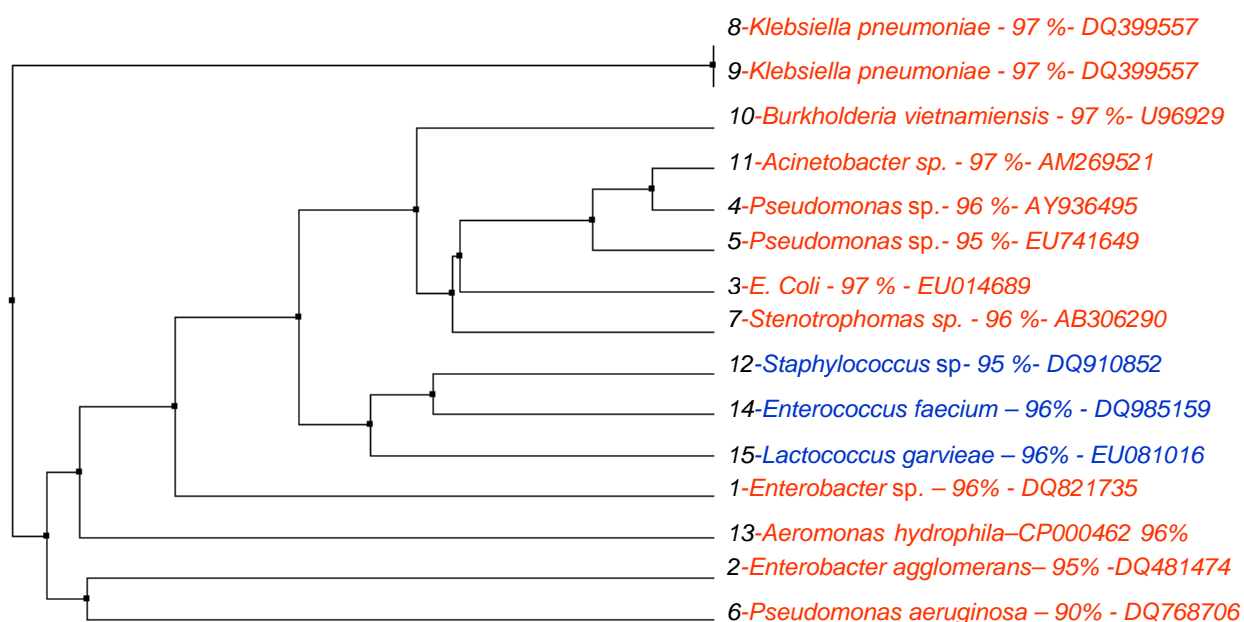


Figure III.12. : Dendrogramme de proximité des séquences et identité des souches bactériennes correspondant aux 15 bandes prélevées sur le gel de DGGE de *Pangasius* capturés dans 5 élevages au Vietnam. Le % de similarité avec les souches des références répertoriées par leur numéro d'accès dans Genbank est donné. En rouge, les souches Gram négatif.

Chaque bande séquencée correspond à une séquence unique suffisamment longue pour permettre une identification par comparaison des séquences avec celles répertoriées dans Genbank (Figure III.12). Douze souches sur les quinze souches identifiées sont Gram négatif. Parmi les souches Gram négatif, la présence des bactéries entériques est importante ce qui peut indiquer la contamination de l'eau d'élevage (Ogbondeinu et Olayemi, 1993 ; Miranda et Zemelman, 2001). Cette prédominance est attendue car les échantillons de poissons analysés contiennent une partie des intestins des poissons. Cette contamination peut aussi être le signe d'une contamination fécale de l'eau des étangs par les déjections des poissons ou par des eaux usées contaminées par l'homme ou les animaux. D'autant plus que ces micro-organismes peuvent survivre très longtemps (Huss, 1995a). Durant les dernière décennies au Vietnam, l'urbanisation et l'industrialisation non contrôlées ont posé un problème de pollution grave dû à la dispersion des eaux d'égout municipale et des effluents industriels dans la plupart des sources d'eau, en particulier dans les rivières. Toutefois, leur présence est le bien le reflet de l'environnement des zones de production et de capture et peuvent donc servir de marqueurs de l'origine géographique du poisson. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Leesing (2005) qui a montré qu'il y a une

prédominance des bactéries à Gram négatif dans la flore bactérienne de *Pangasius* vietnamien. Al-Harbi et Uddin (2004) ont également montré la prédominance des bactéries à Gram négatif chez des Tilapias au cours des saisons. Lakshmanan *et al.* (2002b) ont aussi trouvé que la plupart des bactéries isolées chez le poisson Empereur (*Lethrinus miniatus*) sont des bactéries à Gram négatif. Les bactéries à Gram négatif ont également été trouvées en relativement large proportion chez les truites arc-en-ciel (Spanggaard *et al.*, 2000).

A notre connaissance, peu d'informations relatives aux populations bactériennes du *Pangasius* du Vietnam sont disponibles hormis ceux obtenus par Leasing (2005) par des méthodes de culture dépendante. Cet auteur a ainsi observé que les genres *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* et *Pseudomonas* sont dominants chez les *Pangasius hypophthalmus* provenant du Vietnam. De plus, nos résultats sont assez cohérents avec ceux de Huys *et al.* (2007) qui ont identifié également les genres *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Klebsiella* dans l'eau et les sédiments des fermes aquacoles du Vietnam où sont élevés des *Pangasius*. En revanche, les auteurs (DePaola et Roberts, 1995 ; De Paola *et al.*, 1995 ; Ramos et Lyon, 2000) ont trouvé que sur une autre variété de poisson-chat, le poisson chat de « Channel catfish » (*Ictalurus punctatus*) aux Etats-Unis, les espèces *Aeromonas hydrophila*, *Pleisiomonas shigelloides*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* et *Listeria* sp. dominaient la population bactérienne de ce poisson. La différence entre ces résultats peut donner une idée sur la biodiversité bactérienne en fonction de l'origine géographique, malgré que cette différence puisse également être imputée aux 2 variétés de poisson-chat.

- ***E. coli*** est un bacille aérobie à Gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae* que l'on trouve le plus communément dans les voies intestinales de l'homme et des animaux à sang chaud. Le plus souvent, les souches d'*E. coli* qui colonisent l'appareil gastro-intestinal sont des bactéries commensales inoffensives lorsqu'elles ne jouent pas un rôle important dans le maintien de la physiologie intestinale. Il existe des souches pathogènes d'*E. coli* qui sont responsables de maladies intestinales qui varient en gravité depuis des formes extrêmement bénignes jusqu'à des formes graves, selon un certain nombre de facteurs tels que le type de souche pathogène, la sensibilité de la victime et le degré d'exposition.

E. coli peut être aussi isolée dans les milieux pollués par les matières fécales ou les eaux usées, et ce microorganisme peut s'y multiplier et survivre longtemps (Rhodes et Kator, 1988 ; Jiménez *et al.*, 1989). C'est une souche témoin de contamination fécale. De récents travaux ont montré que *E. coli* et les bactéries coliformes fécales se rencontrent dans les eaux tropicales chaudes non polluées et que *E. coli* peut survivre indéfiniment dans cet environnement (Hazen, 1988 ; Fujioka *et al.*, 1988). Fatal *et al.* (1993) ont trouvé fréquemment des souches d'*E. coli* dans les filets de Tilapia élevés dans des étangs. Cette contamination est au niveau de 10^5 CFU/g et provient des eaux d'égout. Lors de son étude sur la qualité des poissons élevés dans les étangs Vietnamiens, Nguyen *et al.* (2007) ont aussi signalé une forte contamination en coliformes des poissons mais aussi de l'eau de ces étangs. Ceci est peut être du à la contamination fécale de l'eau de rivière qui fournit l'eau aux étangs.

- **Les souches** d'*Enterobacter* sont des bacilles mobiles à Gram négatif, ubiquistes et peuvent se retrouver dans l'eau, dans le sol et chez les animaux (Kim *et al.*, 1998 ; Kandhai *et al.*, 2004). Elles sont aussi retrouvées dans les aliments comme le lait, le fromage & les boissons fermentées (Biering *et al.*, 1989 ; Skaldal *et al.*, 1993 ; Iversen et Forsythe, 2003, 2004 ; Gassem, 2002).

Enterobacter agglomerans est aussi nommé *Pantoea agglomerans* (Gavini *et al.*, 1989). *Enterobacter agglomerans* est une bactérie productrice d'histamine qui peut causer des intoxications alimentaires. Tsai *et al.* (2005) ont trouvé un grand pourcentage d'*E. agglomerans* chez le maquereau sur un marché de Taiwan et ils ont montré qu'il y a corrélation entre sa présence et la formation d'histamine. Kim *et al.* (2001) l'ont aussi trouvé chez le thon albacore.

- **Les souches du genre *Klebsiella*** sont des *Enterobacteriaceae* immobiles et capsulées. Elles sont omniprésentes dans la nature. Elles sont présentes dans le tube digestif et dans l'appareil respiratoire des hommes et des animaux en tant que bactéries commensales. Elles sont aussi trouvées dans les eaux de surface, les eaux d'égout et le sol (Richard, 1982 ; Podschun et Ullmann, 1998). Dans le cas particulier de cette bactérie, le séquençage de 2 bandes voisines a donné le même nom de souche *K. pneumoniae*. L'hypothèse est que cette bactérie présente un polymorphisme de l'ADNr 16S, et de ce fait conduise à la présence de multicopies

du gène de l'ADN 16S. Le génome bactérien d'une seule espèce peut donc conduire à l'apparition de plusieurs bandes sur le gel DGGE (Nübel *et al.*, 1996 ; Van Hannen *et al.*, 1999). Ce résultat est en d'accord avec le travail de Leensing (2005) qui a trouvé qu'une souche pure de *K. pneumoniae* donne 2 bandes différentes peu éloignées sur le gel de DGGE.

Klebsiella pneumoniae est une bactérie ubiquitaire présente dans le tube digestif et dans l'appareil respiratoire des hommes et des animaux en tant que bactérie commensale. Elle est abondante dans le sol et les eaux. Sanni *et al.* (2002) ont mis en évidence la présence de *Klebsiella* spp. dans le Momoni, un produit à base de poisson fermenté au Ghana. Singh et Kulshreshtha (1992) ont trouvé *K. pneumoniae* chez des poissons d'eau douce et aussi d'eau de mer en Inde. *K. pneumoniae* a été aussi identifiée chez le poisson-chat et dans l'eau où ce poisson était élevé (DePaola *et al.*, 1995).

Klebsiella spp. a été identifiée en tant que bactérie productrice d'histamine, capable de produire dans un bouillon de culture plus de 2000 ppm d'histamine (Lopez-Sabater *et al.*, 1994). *K. pneumoniae* a été impliqué en tant qu'organisme responsable de la formation d'histamine à un niveau toxicologiquement significatif lors d'une intoxication alimentaire chez les poissons scombridés (Taylor et Speckard, 1983).

Chez l'homme, *K. pneumoniae* est responsable d'infection diverses (infections suppuratives, infections urinaires, infections respiratoires...). Elle est responsable d'environ 5 à 10% des infections nosocomiales (Keynan et Rubinstein, 2007).

- ***Aeromonas hydrophila*** est un bacille anaérobie facultatif, en forme de bâtonnet, non sporulé et Gram négatif qui appartient au genre *Aeromonas* (Buchanan et Palumbo, 1985). Depuis ces dernières années, les souches d'*Aeromonas* sp. mobiles, notamment *A. hydrophila*, attirent de plus en plus l'attention comme agents possibles de maladies diarrhéiques transmises par les aliments. Toutefois, le rôle d'*Aeromonas* comme pathogène entérique n'est pas encore parfaitement élucidé. Des travaux antérieurs ont montré clairement que le genre *Aeromonas*, dont *A. hydrophila*, est très répandu dans l'environnement. Ces microorganismes ont été trouvés dans des lacs, des rivières, de l'eau de mer, des effluents d'égout et de l'eau potable (Allen *et al.*, 1983 ; Nakano *et al.*, 1990 ; Poffe et Op de Beeck, 1991 ; Bernagozzi *et al.*, 1995 ; Chauret *et al.*, 2001). Cet organisme peut aussi être

facilement isolé à partir de la viande, du poisson, des fruits de mer et les légumes frais (Isonhood et Drake, 2002).

Les souches d'*Aeromonas* environnementales et les isollements prélevés sur les aliments se multiplient à la température de réfrigération (Kirov *et al.*, 2008). *Aeromonas* est très sensible aux conditions acides ainsi qu'au sel et la croissance ne devrait pas poser de problème dans les aliments dont le pH est inférieur à 6,5 et la teneur en NaCl supérieure à 3% (Huss, 1995b). Dans une étude sur l'eau des fermes aquacoles de poisson-chats aux Pays-Bas, Penders et Stobberingh (2008) ont trouvé une grande variété d'*Aeromonas* et la plupart de ces bactéries sont antibiorésistantes à l'ampicilline et à l'oxytétracycline.

Aeromonas hydrophila est l'espèce représentative du genre *Aeromonas*. Daskalov (2006) a rapporté que cette espèce a été trouvée dans un large éventail de produits alimentaires, incluant la viande, le lait, les légumes et les produits halieutiques. Elle est fréquemment trouvée chez les poissons d'eau douce, et parfois chez des poissons d'eau de mer, comme par exemple la maladie de l'ulcère de la morue (Larsen et Jensen, 1977). Wang et Silva (1999) ont trouvé que sur 238 filets de poisson-chats (channel catfish = *Ictalurus punctatus*), 36,1% ont été contaminés par *A. hydrophila*. Davies *et al.* (2001) ont étudié l'incidence des bactéries pathogènes sur les poissons européens (poissons frais des marchés de France, d'Angleterre, de Grèce et du Portugal). *A. hydrophila* a été détectée sur tous les sites, avec une incidence globale de 40%. Tsai et Chen (1996) et Vivekanandhan *et al.* (2005) ont aussi montré que l'incidence d'*A. hydrophila* sur les poissons des marchés de Taiwan et d'Inde étaient de 22% et 33,5% respectivement. Cependant, des opinions se contredisent sur le rôle précis d'*Aeromonas hydrophila* comme pathogène des poissons. Quelques chercheurs affirment que cette bactérie est seulement un envahisseur secondaire des poissons précédemment affaiblis, alors que d'autres croient que *A. hydrophila* est une pathogène primaire des poissons d'eau douce. Elle peut être associée à plusieurs maladies comme la putréfaction de la queue, de l'aileron ou les septicémies hémorragiques (Mizayaki et Kaige, 1986 ; Lu., 1992 ; Shao *et al.*, 2004). Etant une bactérie psychotrope, elle peut se développer dans les aliments au cours de la réfrigération. Sur le poisson, *A. hydrophila* peut transformer le Triméthylamine oxyde en Triméthylamine (TMA). La TMA contribue en particulier à la mauvaise odeur des poissons (Gram et Dalgaard, 2000).

Depuis quelques années, le secteur de la santé publique reconnaît les espèces du genre *Aeromonas* comme des bactéries pathogènes potentielles ou émergentes. Ces bactéries peuvent causer des diarrhées, les enfants étant la population la plus sensible. La plupart des *Aeromonas* sont psychrotrophes et peuvent se multiplier dans les aliments pendant un entreposage frigorifique. Les souches d'*Aeromonas* ne sont pas résistantes aux procédés technologiques et sont éliminés par un traitement thermique (Isonhood et Drake, 2002).

- **Les souches du genre *Acinetobacter*** sont des coccobacilles à Gram négatif, ubiquitaires dans le sol, les eaux, les végétaux et les animaux. Elles sont fréquemment isolées des eaux usées et des boues activées des stations d'épuration. Elles sont également présentes en grand nombre dans la flore bactérienne des aliments frais ou altérés, notamment les carcasses de volaille et de poisson, mais aussi les viandes des animaux de boucheries, le lait et les produits laitiers (Euzéby, 2003).

Des souches d'*Acinetobacter* ont été retrouvés dans des perches fraîches du Nil (Gram *et al.*, 1990) et sur la carpe (*Cyprinus carpio*) (Mahmoud *et al.*, 2004). Sugita *et al.* (1996) ont également identifié cette espèce dans l'intestin du poisson-chat (*Ictalurus punctatus*). Guaedbassi *et al.* (1999) ont constaté que les souches d'*Acinetobacter* isolées des habitats aquacoles appartenaient principalement aux espèces *A. johnsonii* et *A. Iwoffii*.

Des souches d'*Acinetobacter* ont été détectées à hauteur de 10^4 UFC/mL dans de l'eau (LaCroix et Cabelli, 1982) et sont considérés comme un des genres principaux parmi les bactéries hétérotrophes aérobies isolées dans des poissons d'eau douce (Allen *et al.*, 1983). Ce genre a été utilisé en tant qu'indicateur pour la résistance antibiotique bactérienne dans les fermes aquacoles d'eau douce en raison de leur distribution omniprésente et leur capacité particulière à développer une résistance aux antibiotiques lorsqu'ils sont soumis à une pression antibiotique sélective (Towner, 1997 ; Guardabassi *et al.*, 1998). Miranda et Zemelman (2002) ont rapporté une forte résistance à l'oxytétracycline d'*Acinetobacter iwoffii* trouvé chez le saumon chilien.

- **Les *Pseudomonas*** sont des bacilles à Gram négatif largement répandus dans la nature que l'on rencontre dans les sols, sur les végétaux et surtout dans les eaux

douces et marines. De nombreuses souches peuvent se développer à basse température (bactéries psychrophiles) et contaminent les produits alimentaires conservés au réfrigérateur. Ces bactéries peuvent être dénombrées spécifiquement dans les matières premières et produits finis (Guiraud, 1998). Des souches de *Pseudomonas* sont fréquemment associées aux poissons (Cahill, 1990) et ont été isolées de la peau, les ouïes et l'intestin (Trust and Sparrow, 1974 ; Muroga *et al.*, 1987). Généralement, la flore bactérienne des poissons, comprenant des souches de *Pseudomonas*, reflète la population microbienne de l'habitat aquatique et est influencée par la charge bactérienne de l'eau et sa salinité (Tripathy *et al.*, 2007). Les souches de *Pseudomonas* sont nombreuses et très répandues, elles peuvent être impliquées dans les maladies des poissons et peuvent agir en tant qu'envahisseurs secondaires en complémentarité avec des bactéries pathogènes ou d'autres facteurs. En aquaculture, *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* sont considérées comme des espèces pathogènes opportunistes (Shiose *et al.*, 1974). Cependant, d'autres espèces de ce genre peuvent également être des bactéries pathogènes opportunistes sérieuses comme *P. anguilliseptica* chez l'anguille (*Anguilla japonica*) (Wakabayashi et Egusa, 1972), *P. chlororaphis* chez la truite d'Amago (*Oncorhynchus rhodurus*) (Hatai *et al.*, 1975), *P. plecoglossicida* chez l'ayu (*Plecoglossus altivelis*) (Kobayashi *et al.*, 2000) et *P. putida* chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Altinok *et al.*, 2006).

Les *Pseudomonas* sont responsables de la dégradation spécifique des poissons au cours de leur stockage sur glace ou lors de la réfrigération (Gram et Dalgaard, 2000 ; Lakshmanan *et al.*, 2002b). De plus, il a été rapporté que les *Pseudomonas* peuvent empêcher la croissance des bactéries produisant du disulfure d'hydrogène (H₂S), notamment *Shewanella putrefaciens*, dues à la capacité des *Pseudomonas* de produire des sidérophores et cette interaction peut être le facteur principal régissant le développement de la flore de détérioration des poissons au cours du stockage (Gram et Melchiorson, 1996).

Les *Pseudomonas* sont réputés pour leurs capacités à résister à de nombreux antibiotiques (Miranda et Rojas ; 2007 ; Akinbowale *et al.*, 2007). Cela peut expliquer sa position dominante chez les poissons du Vietnam chez les éleveurs qui utilisent des antibiotiques pour traiter les maladies des poissons.

- ***Burkholderia vietnamiensis*** appartient au genre *Burkholderia*, qui sont des bacilles droits à Gram négatif, aérobies stricts et mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires (Yabuchi *et al.*, 1992). Les espèces du genre *Burkholderia* ont pour principal habitat le sol, l'eau et les plantes mais quelques espèces sont pathogènes pour l'homme ou l'animal ou se comportent comme des pathogènes opportunistes.

Burkholderia vietnamiensis est une protéobactérie fixatrice d'azote de la rhizosphère du riz isolée des sols sulfatés acides (Tran Van *et al.*, 1996). Elle a une fixation d'azote adaptée aux pH acides. Le sol du delta du Mékong est naturellement riche en sulfates, il est donc un habitat favorable pour cette bactérie.

- **Les souches du genre *Stenotrophomonas*** sont des bacilles à Gram négatif, non sporulées, mobiles grâce à la présence de plusieurs flagelles polaires. Ce sont des espèces ubiquistes, présentes dans le sol, les plantes, les eaux de surfaces et les eaux usées (Euzéby, 2005). L'espèce représentative de ce genre, *Stenotrophomonas maltophilia*, a reçu beaucoup d'attention durant la dernière décennie en raison de son rôle comme microorganisme pathogène opportuniste dans un certain nombre de syndromes cliniques tels que la mucoviscidose, l'endocardite, l'infection de la peau et des tissus mous et l'infection urinaire (Robin et Janda, 1996). De plus, *S. maltophilia* a été aussi trouvée dans certains produits alimentaires. L'existence de la *S. maltophilia* dans le lait cru (Liptopolou-Tzanetaki et Vafopoulou-Mastrojiannaki, 1995) et dans l'eau en bouteille (Jayasekara *et al.*, 1998) a été rapportée. Dans les produits halieutiques, cette espèce a été retrouvée dans la dorade coryphène (Frank *et al.*, 1985) et dans le thon albacore (*Thunnus alaluga*) (Ben-Girey *et al.*, 1999 a, b, 2000). A côté de sa nature pathogène, certaines caractéristiques intrinsèques de *S. maltophilia* sont concernées par la sûreté alimentaire. Elle est une forte productrice de cadavérine et peut également produire de l'histamine dans le thon albacore frais et congelé (Ben-Gigirey *et al.*, 2000). L'histamine a été décrite pour être responsable de l'empoisonnement scombridé, une des plus fréquentes maladies rapportées en Europe et aux Etats-Unis. Le rôle de la cadavérine ou putrescine comme renforceur de la toxicité de l'histamine a été largement documenté (Taylor et Sumner, 1987 ; Antoine *et al.*, 2002). Les espèces bactériennes comme *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia alvei*, *Enterobacter aerogenes* et certains *Pseudomonas* ont été traditionnellement isolés dans des poissons incriminés dans l'empoisonnement scombridé (Ryser *et al.*, 1984 ; Lopez-Sabater *et al.*, 1994). Le fait que la présence

de *S. maltophilia* dans les produits halieutiques a été rapportée tout récemment est peut être dû au fait que cette espèce pourrait être dominée par les bactéries citées ci-dessus ou par d'autres bactéries de concurrence. Sa détection est facilitée grâce aux techniques de biologie moléculaire (Ben-Gigirey *et al.*, 2002).

- ***Lactococcus garvieae*** appartient au genre *Lactococcus*. Ce sont des bacilles à Gram positif, anaérobies facultatifs, non-mobiles, non sporulés (Ravelo *et al.*, 2001). La lactococcosis causée par *L. garvieae* est une maladie infectieuse importante affectant une grande variété de poissons partout dans le monde. *L. garvieae* a été isolée dans les fermes aquacoles en eau douce et marine (Vendrell *et al.*, 2006). Elle a été rapportée comme un agent responsable de la mortalité de la truite arc-en-ciel en Australie et en Afrique du Sud (Carson *et al.*, 1993), au Portugal (Pereira *et al.*, 2004) et en Turquie (Diler *et al.*, 2002). *L. garvieae* a été aussi trouvée à Taiwan sur des crevettes roses géantes d'eau douce (*Macrobrachium rosenbergii*) (Chen *et al.*, 2001). Cai *et al.* (1999) ont montré la dominance de *L. garvieae* sur la carpe (*Cyprinus carpio*) pêchée dans la rivière de Thajin en Thaïlande.

L'entrée d'un nouveau lot de poissons dans une ferme aquacole est la raison la plus fréquente de l'introduction de ce bacille pathogène. Les poissons malades portent *L. garvieae* dans leur flore microbienne intestinale et peuvent évacuer cette bactérie dans leurs fèces, infectant les poissons sains de l'étang. L'évolution de la maladie dépend notamment de la température et de la qualité microbiologique de l'eau (Vendrell *et al.*, 2006). *L. garvieae* a été isolée de truites arc-en-ciel saines d'une ferme aquacole. La maladie ne se développe que quand les conditions environnementales sont favorables à cette souche (Cheng *et al.*, 2002). Il est important de souligner que cette bactérie pathogène cause des pertes économiques sérieuses dues aux taux élevés de la mortalité (jusqu'à 50%) et à la diminution du taux de croissance. Dans le cas de notre étude, *L. garvieae* a été trouvée dans une seule ferme aquacole pendant la saison des pluies. Quand nous avons voulu faire les prélèvements lors de la saison sèche, cette ferme était fermée. Le patron de cette ferme nous a raconté que ses poissons ont contacté une maladie qui lui a fait perdre beaucoup d'argent. On pense que ceci est peut être dû à *L. garvieae*.

- **Les souches du genre *Staphylococcus*** sont des coques à Gram positif, immobiles, non sporulés, groupés généralement en amas irréguliers, appartenant à

la famille des *Micrococcaceae*. Leur habitat est souvent le sol, les eaux douces et les aliments (Guiraud, 1998). Sugita *et al.* (1996) ont isolé des *Staphylococcus* chez la truite arc-en-ciel et Apun *et al.* (1999) en ont également isolé dans les intestins de poissons d'eau douce en Malaisie. Ces bactéries ont été aussi trouvées sur le tilapia (Al-Harbi et Uddin, 2004). Huys *et al.* (2007) ont identifié un grand nombre de *Staphylococcus* sur le *Pangasius* du Vietnam, dont *S. arlettae*, *S. haemolyticus* et *S. epidermidis*. Fernandes *et al.* (1997) ont aussi trouvé *S. aureus* sur des filets de poisson-chat (*Ictalurus punctatus*). La fréquence de portage de cette espèce est élevée en été et faible en hiver.

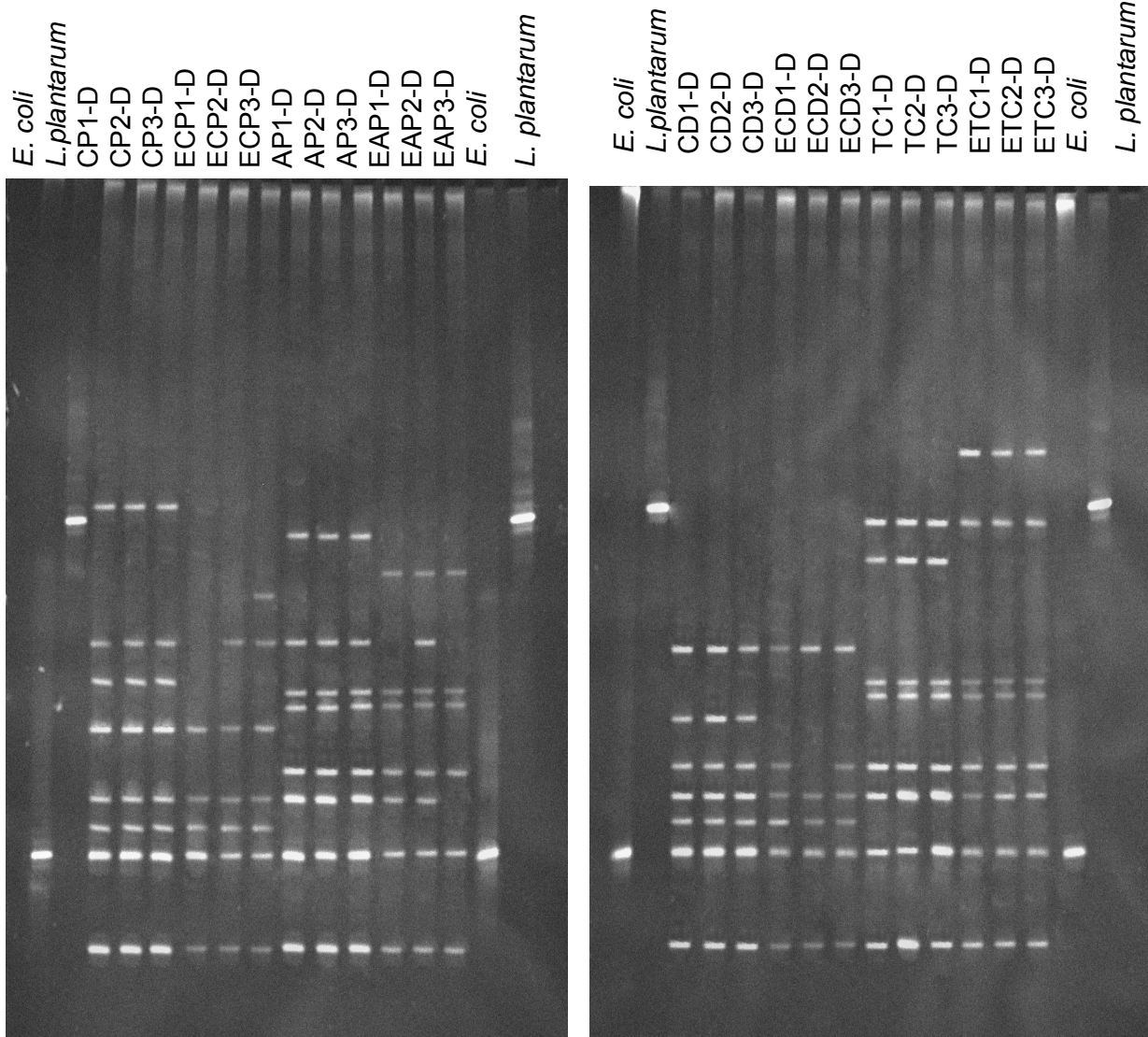
- **La souche d'*Enterococcus faecium*** appartient au genre *Enterococcus*. Ce sont des bactéries coques à Gram positif qui se présentent sous forme de chaîne. Elles appartiennent à la flore commensale notamment dans les tractus digestif et génital. Les *Enterococcus* sont souvent utilisés pour la fermentation alimentaire comme le fromage artisanal (Giraffa, 2003) et la saucisse artisanale (Hugas *et al.*, 2003). Les deux espèces les plus souvent décrites dans la flore de fermentation sont *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*. De plus, dans certains pays, ces bactéries sont employées comme probiotiques pour favoriser l'environnement intestinal dans le but de renforcer le système immunitaire des animaux (Scharek *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2008). Au Vietnam, les éleveurs rajoutent souvent des probiotiques aux aliments des poissons pour augmenter leur capacité à résister aux maladies. Cela pourrait expliquer la présence des *Enterococcus faecium* chez les *Pangasius* au Vietnam.

En comparaison avec le travail de Leasing (2005) sur les bactéries de *Pangasius* isolées par les techniques traditionnelles, on peut trouver quelques nouvelles souches de bactéries comme *Burkholderia vietnamiensis* ou bien *Enterococcus faecium*. Il est possible que ces espèces soient présentes mais n'aient pas pu être isolées par la méthode classique, ou qu'elles ne soient plus présentes puisque c'était des prélèvements différents dans des fermes différentes. Il est important d'observer qu'un certain nombre des souches isolées appartiennent à des genres ou des espèces dont la présence témoigne de l'environnement, ou des pratiques d'élevage avec une grande majorité de souches potentiellement pathogènes pour les poissons et les consommateurs.

III.2.5. Étude de la relation entre l'eau des étangs d'élevage et les *Pangasius* capturés dans ces étangs

Le rôle de l'environnement des élevages sur le marquage d'origine des poissons est à l'origine de ce travail aussi avons-nous voulu explorer les relations qui existent entre la communauté bactérienne de l'eau et celle présente sur les poissons par DGGE. Les échantillons d'eau et de poissons ont été prélevés pendant la saison sèche dans 4 districts différents de la région d'An Giang dans le delta du Mékong au Vietnam.

Sur les gels DGGE, on observe les bandes nettes et bien distinctes (Figure III.13). Le nombre des bandes des profils de DGGE varie de 7 à 8 bandes pour les poissons et de 6 à 8 bandes pour l'eau de l'étang. Les profils DGGE d'ADN bactérien extrait des poissons d'un même étang sont identiques ce qui confirme les résultats obtenus avec les bars en France. Par contre les profils DDGE des ADN bactériens extraits de l'eau sont sensiblement différents. Nous pouvons observer que les profils DGGE des bactéries extraites des poissons et de l'eau d'un même étang sont étroitement liés car ils possèdent des bandes communes. Les résultats de l'analyse statistique sont présentés dans la Figure III.14. Deux clusters sont bien distingués avec 87% de similarité et divisent les échantillons en deux classes. Le premier cluster correspond aux poissons et à l'eau des étangs des districts d'An Phu et de Tan Chau ; le deuxième cluster à celui des poissons et à l'eau des étangs de districts de Chau Doc et de Chau Phu. Cette séparation est bien cohérente avec les résultats obtenus sur la discrimination des poissons dans notre étude antérieure. A l'intérieur de chaque cluster, on peut également regrouper les profils des poissons et de l'eau correspondante (similarité proche de 95% voire plus). Ces résultats confirment notre hypothèse initiale à savoir que l'identité des étangs et donc l'eau qu'ils contiennent participe au marquage d'origine et qu'il existe un lien entre les flores microbiennes des poissons et celles de l'eau des étangs où vivent les poissons.



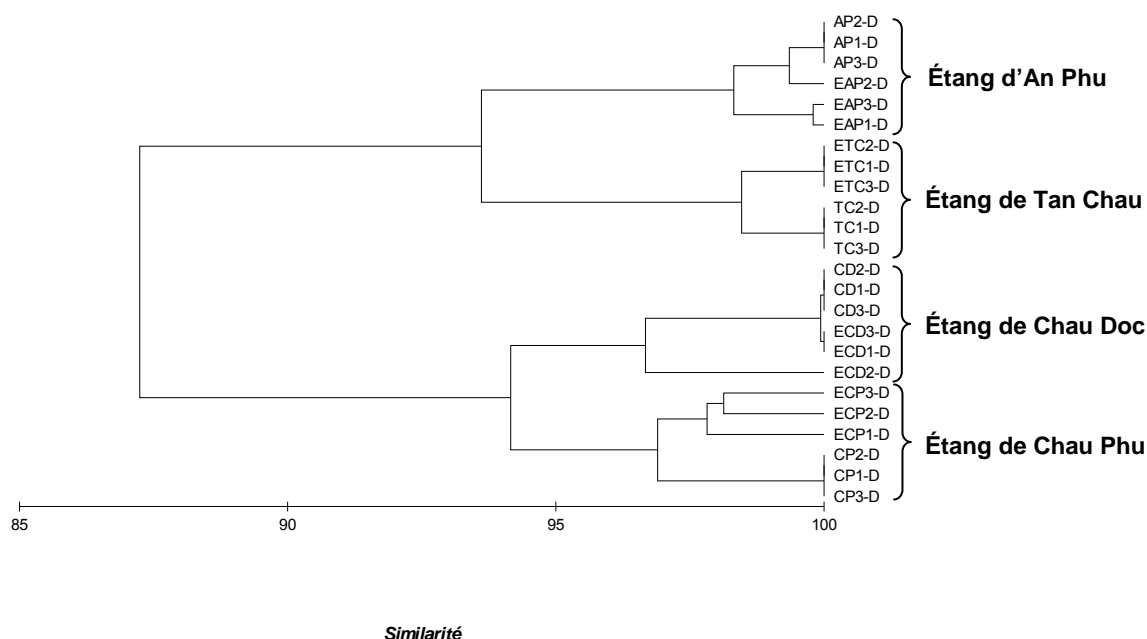
CP : Poisson de Chau Phu ; AP : Poisson d'An Phu ; CD : Poisson de Chau Doc ; TC : Poisson de Tan Chau.

ECP : Eau de l'étang du district de Chau Phu ; EAP : Eau de l'étang du district d'An Phu ; ECD : Eau de l'étang du district de Chau Doc ; ETC : Eau de l'étang du district de Tan Chau.

1, 2, 3: répétition des poissons

D : saison sèche

Figure III.13. : Photo des gels de DGGE d'ADN bactériens extraits de l'eau et des *Pangasius* d'un même étang de 4 districts de la région d'An Giang.



CP : Poisson de Chau Phu ; AP : Poisson d'An Phu ; CD : Poisson de Chau Doc ; TC : Poisson de Tan Chau.

ECP : Eau de l'étang du district de Chau Phu ; EAP : Eau de l'étang du district d'An Phu ; ECD : Eau de l'étang du district de Chau Doc ; ETC : Eau de l'étang du district de Tan Chau.

1, 2, 3: répétition des poissons

D : saison sèche

Figure III.14. : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN bactériens extraits de l'eau et des *Pangasius* d'un même étang de quatre districts de la région d'An Giang.

Bien qu'il y ait aucune certitude de l'existence des bactéries strictement aquatiques, l'opinion la plus répandue parmi les divers auteurs est que la majorité des bactéries trouvées dans l'environnement aquatique trouve son origine dans le sol. Ces bactéries sont transférées vers l'eau par la pluie ou par introduction accidentelle. Ces bactéries peuvent être aussi la conséquence directe des activités humaines (Toranzo *et al.*, 2005).

En effet, les bactéries présentes dans l'eau peuvent être ingérées par les poissons et ainsi modifier les flores dominantes de leurs organes (Strom et Ringgo, 1993 ; Sugita *et al.*, 1996 ; Apun *et al.*, 1999). Miranda et Zemelman (2002) ont trouvé que des bactéries présentes naturellement dans l'eau, sont aussi identifiées également dans des saumons d'eau douce. Les études de De Sousa et Silva-Sousa (2001) sur la communauté bactérienne de la rivière Congonhas au Brésil ont montré qu'il y a une relation directe entre les flores bactériennes aquatiques et les bactéries commensales des poissons. Les bactéries des poissons appartiennent aux genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Enterobacteriaceae*, *Micrococcus*,

Bacillus et *Lactobacillus*. Dans l'eau, les auteurs ont trouvés les genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Enterobacteriaceae*, *Micrococcus*, *Bacillus* et *Flavobacterium*. Al-Harbi et Uddin (2003) ont aussi prouvé une similarité entre les bactéries des poissons avec celles de l'eau et des sédiments où sont élevés les poissons. Les bactéries comme *Corynebacterium urealyticum*, *Shewanella putrefaciens*, *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli* sont présentes sur les poissons ainsi que dans l'environnement de l'étang d'élevage du poisson. Romeo et Navarrete (2006) ont suggéré par DGGE que les bactéries majeures des saumons de coho (*Oncorhynchus kisutch*) pourraient provenir de l'eau. Enfin, nos résultats se rapprochent de ceux de Syvokienė et Mickėnienė en 1998 qui ont constaté que la flore microbienne de l'eau des élevages influençait directement celle de l'intestin et des ouïes des tilapias analysés avec une biodiversité bactérienne plus importante dans l'intestin que dans l'eau.

III.2.6 Comparaison de la totalité des profils DGGE des poissons de différentes origines géographiques

L'utilisation de la PCR-DGGE pour caractériser globalement les flores bactériennes de poissons d'élevage afin d'en déterminer l'origine géographique a conduit à une multitude de profils différents. Nous avons voulu savoir comment ces profils se différenciaient lors d'une analyse de similarité. Afin de simplifier les calculs, nous avons décidé de prendre un seul profil représentatif pour toutes les répétitions des poissons d'un même aquarium ou d'un même étang qui, rappelons le, ont obtenu le même profil bactérien.

L'analyse statistique des profils DGGE obtenus pour tous les échantillons des différentes espèces et de différentes origines est représentée sur la figure III.12. On constate que les profils des poissons asiatiques se regroupent dans un même cluster avec 65% de similarité, alors que les profils des poissons français se regroupent aussi dans un même cluster avec 62% de similarité. En outre, les profils des poissons asiatiques et européens se distinguent clairement avec aucune similarité, sans doute en raison de la nature même des milieux aquatiques qui diffèrent très fortement. Les poissons de France sont élevés dans un milieu marin ou océanique salé alors que les autres poissons sont des poissons d'eau douce. Il est important de noter que lorsqu'on compare globalement tous les profils, l'effet de la

région est bien montré, c'est-à-dire que les poissons d'une même région se regroupent dans un même cluster. Ces résultats laissent envisager que la création d'une banque de données alimentée par des profils de PCR-DGGE réalisés selon un protocole standardisé sur des poissons d'origine connue est possible et qu'elle pourrait être utilisée pour comparer un profil inconnu à des profils de poissons d'origine connue.

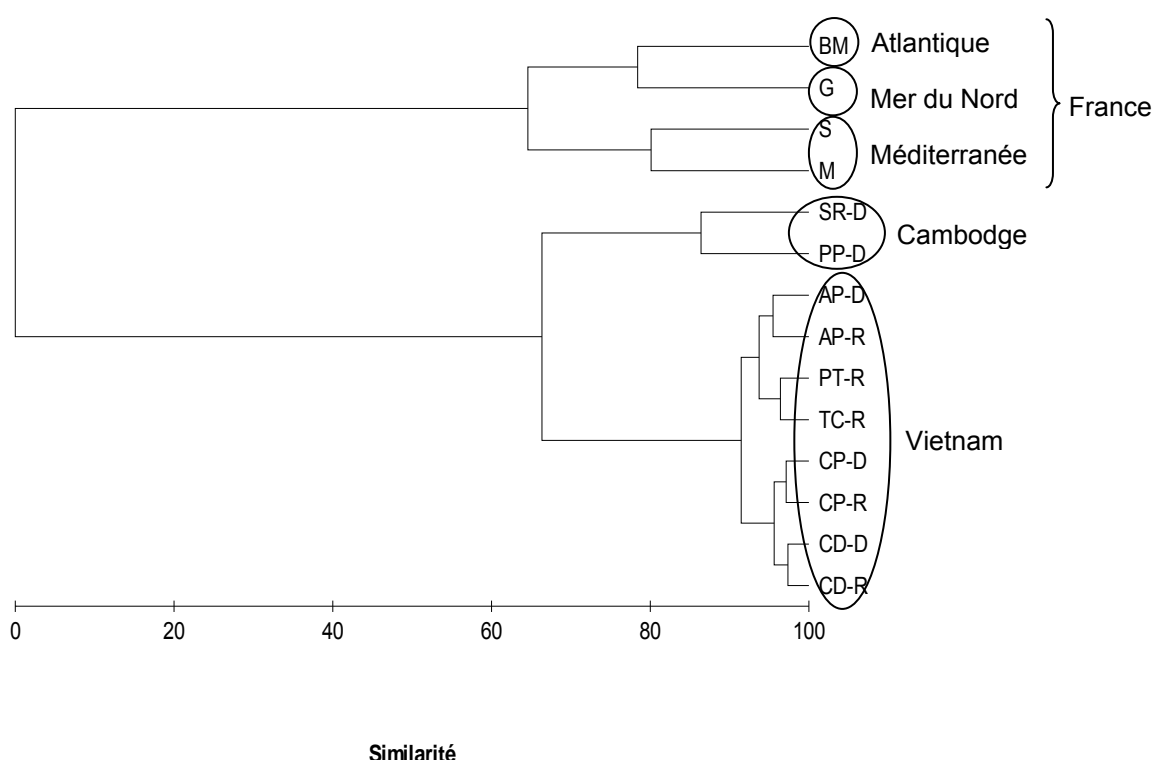


Figure III.15. : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN bactériens extraits de poissons différents et d'origines différentes.

III.3. Étude de la pérennité du marquage microbien

Nous avons montré qu'il était possible de caractériser des poissons par leurs profils bactériens mis en évidence par la PCR-DGGE et que ces profils pouvaient être reliés à une origine géographique assez finement, ainsi ces profils bactériens constituent un marquage de l'origine. Ce marquage repose sur la présence de telle ou telle souche bactérienne particulière des poissons et sa combinaison avec d'autres souches. Pour valider la méthode proposée, il nous a semblé nécessaire de

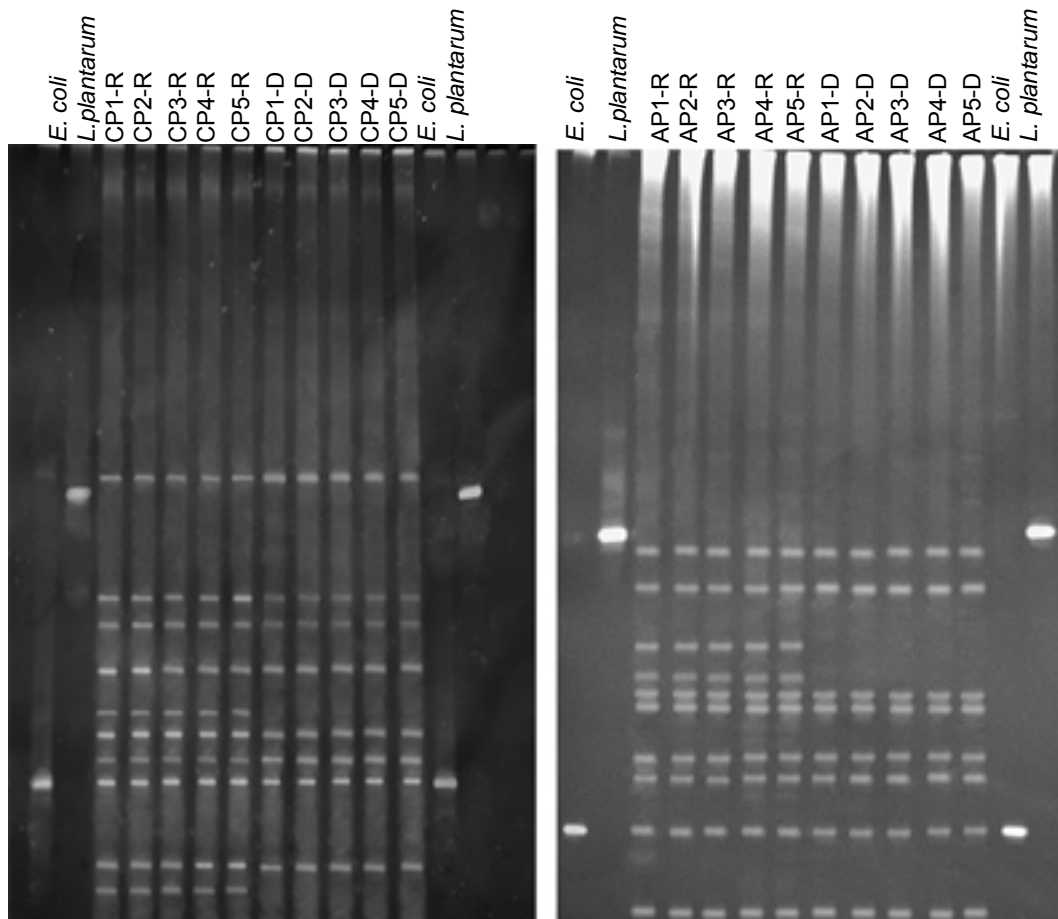
savoir si le marquage ainsi défini était pérenne tout au long de l'année, selon les saisons. S'il évoluait en fonction des pratiques d'élevage, ou s'il se conservait tout au long des procédés de transformation du poisson entier en produits commerciaux.

III.3.1. Influence de la saison sur le marquage microbien

Au Vietnam, il y a 2 saisons différentes, la saison des pluies d'avril à novembre et la saison sèche de décembre à mars. L'échantillonnage a été réalisé lors de la saison des pluies dans 5 districts différents comme décrit précédemment. Cependant, un étang a été fermé lors de la campagne de prélèvements de la saison sèche, il s'agit de l'étang du district de Phu Tan. C'est pourquoi pour la saison sèche, l'échantillonnage n'a été fait que dans 4 districts.

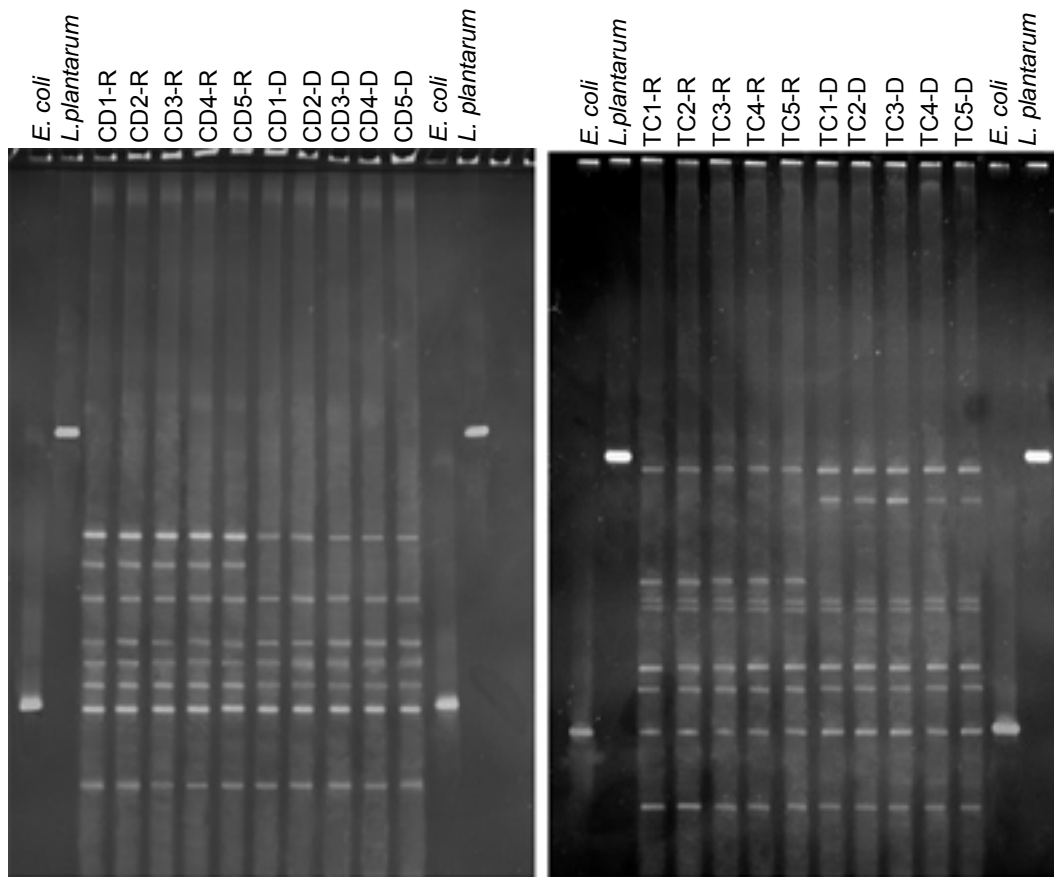
Les résultats d'électrophorèse de DGGE d'ADN bactérien extrait des poissons capturés dans les mêmes étangs pendant 2 saisons différentes sont montrés dans les figures III.16 et III.17. Les bandes de profils DGGE de chaque piste sont intenses et distinctes. Le nombre des bandes des profils DGGE dans les différents étangs varie de 8 à 10 bandes pendant la saison des pluies, et de 7 à 8 bandes pendant la saison sèche. Pour un même étang, les profils DGGE des poissons sont identiques, et on observe une diminution du nombre de bandes de DGGE à la saison sèche en comparaison avec la saison des pluies. Cependant, on peut constater que quelques bandes dominantes restent présentes au cours des deux saisons.

L'analyse statistique (Figure III.18.) montre que quelque soit la saison, les profils sont séparés en deux clusters principaux : (1) le premier contient les poissons qui viennent des districts de An Phu et de Tan Chau ; (2) le deuxième contient les poissons venant des districts de Chau Doc et de Chau Phu. Cette division est similaire à celle observée pour les poissons capturés pendant la saison de pluies. A l'intérieur de chacun des groupes, les profils d'une même origine sont les plus proches et sont éloignés de ceux des poissons de sites différents. L'effet saison semble très peu marqué et ne modifie pas la capacité à différencier les poissons d'origine différente. Pour confirmer nos observations, nous avons réalisé une analyse factorielle pour comparer la similarité des profils dans les 4 districts de la région d'An Giang au cours des deux saisons (Figure III.19). Le premier plan à 2 variances décrit 85% des variations des données avec une bonne discrimination pour les 4 groupes différents issus des 4 districts différents quelque soit la saison.



CP : district de Chau Phu ; AP : district de An Phu
 1, 2, 3, 4, 5 : répétition des poissons
 R : saison des pluies ; D : saison sèche

Figure III.16. : Photos des gels de DGGE d'ADN bactérien extrait des *Pangasius* issus de districts différents de la région d'An Giang pendant la saison des pluies et la saison sèche.



CD : district de Chau Doc ; TC : district de Tan Chau
1, 2, 3, 4, 5 : répétition des poissons
R : saison des pluies ; D : saison sèche.

Figure III.17. : Photos des gels de DGGE d'ADN bactérien extrait des *Pangasius* issus de districts différents de la région d'An Giang pendant la saison des pluies et la saison sèche.

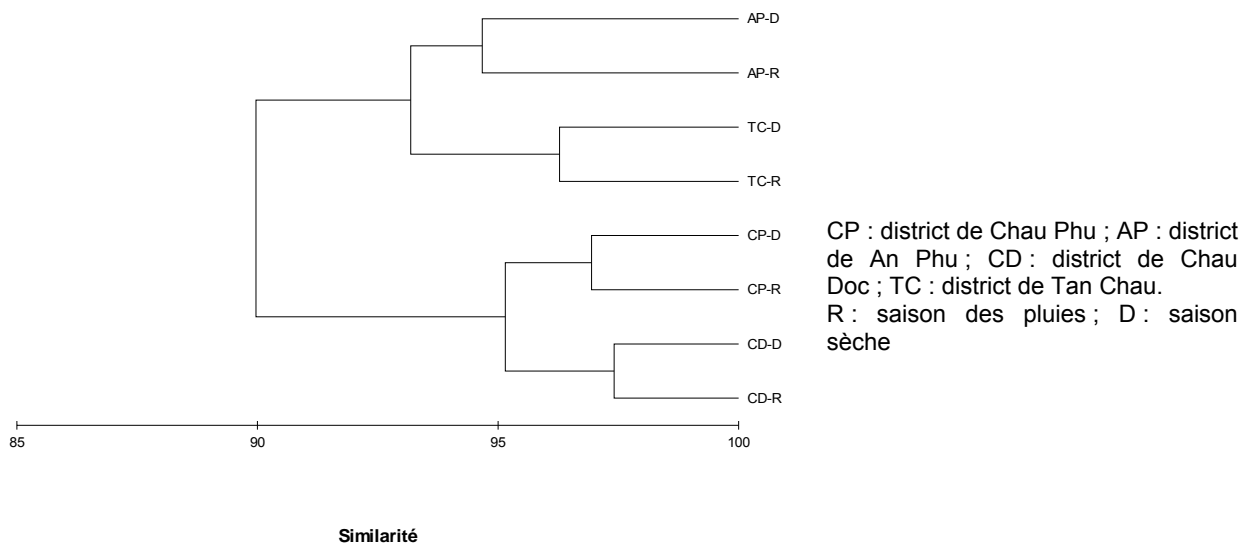
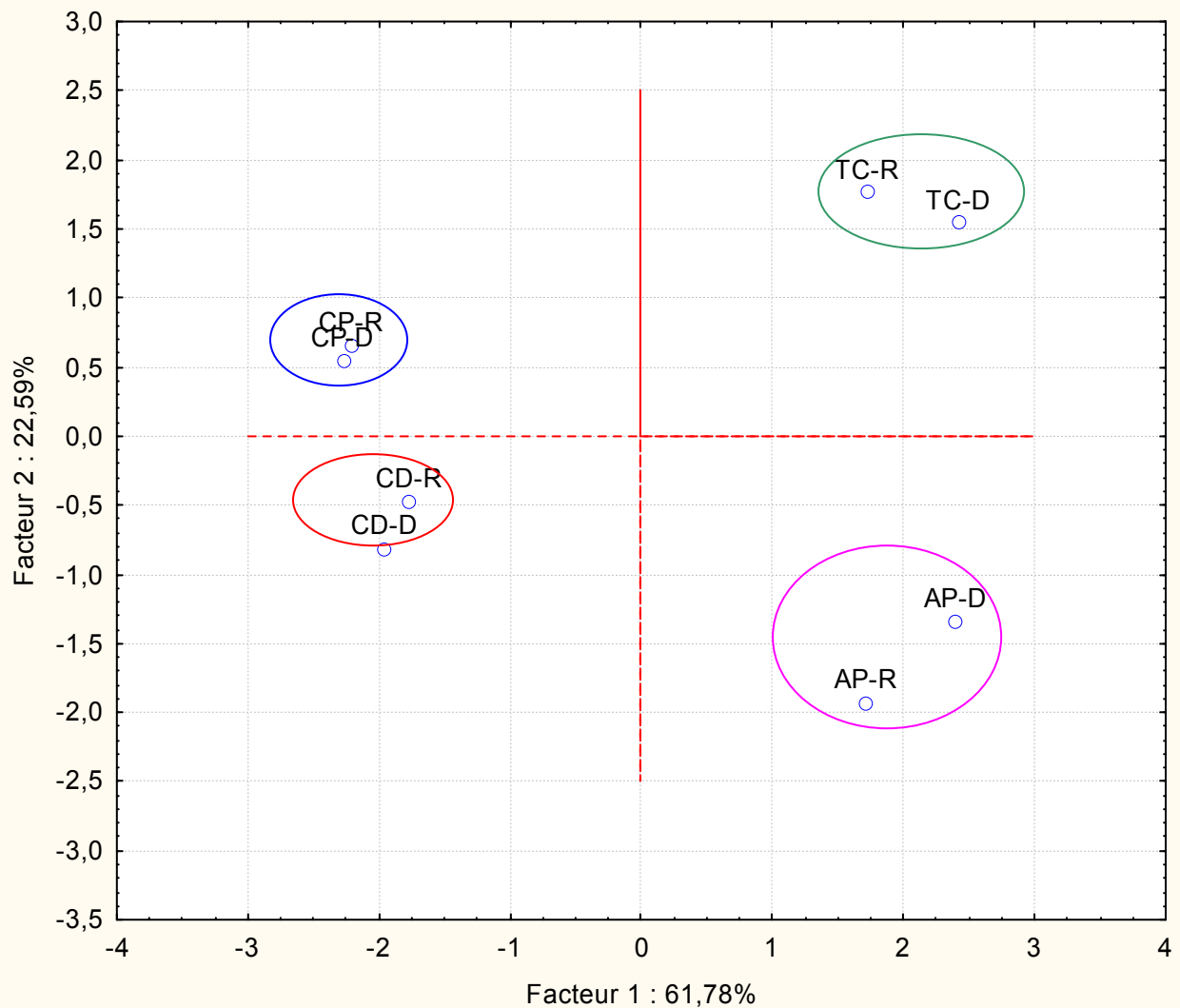


Figure III.18. : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN bactérien de *Pangasius* issus de 4 districts de la région d'An Giang capturés pendant la saison des pluies et la saison sèche.



CP : district de Chau Phu ; AP : district de An Phu ; CD : district de Chau Doc ; TC : district de Tan Chau.
R : saison des pluies ; D : saison sèche.

Figure III.19. : Analyse factorielle des profils DGGE des *Pangasius* capturés dans 4 districts différents de la région d'An Giang pendant la saison des pluies et la saison sèche.

Ces résultats sont similaires à ceux de Van der Gucht *et al.* (2005) qui ont caractérisé la communauté bactérienne de 4 lacs situés dans 2 régions différentes en Belgique au cours des saisons. La communauté bactérienne a été clairement différenciée dans les quatre lacs. Cependant, ils ont trouvé une forte similarité de la population bactérienne dans les lacs de la même région quel que soit la saison. A savoir que la différence de communauté bactérienne entre les lacs est plus importante que la différence de communauté bactérienne d'un même lac au cours des saisons. La variation des flores bactériennes sur des filets de poisson-chat au cours de la saison a été étudiée par Fernandes *et al.* (1997). Ces auteurs ont montré que le nombre des *E. coli* et *S. aureus* est plus élevé en été qu'en hiver. Al-Harbi et Uddin (2004) ont aussi trouvé une grande différence lors de l'analyse des bactéries

intestinales des Tilapias au cours des saisons. Cependant, selon ces auteurs, ces différences sont plutôt dues à la variation de la température. En effet, en été, la température élevée de l'eau favorise la croissance des bactéries mésophiles et l'augmentation de la charge bactérienne du poisson (Hossain *et al.*, 1999). Dans notre étude, il apparaît que le nombre des bandes sur le profil pour la saison des pluies est plus nombreux que celui en saison sèche, c'est-à-dire que les bactéries sont plus nombreuses en saison des pluies qu'en saison sèche. Cependant, le peu de différence observé peut être expliqué par le fait que dans le delta du Mékong, la température est relativement stable (aux alentours de 29°C) au cours des 2 saisons. La différence de température ne joue donc pas un rôle important sur la diversité bactérienne. Par contre, la région du delta du Mékong est souvent inondée lors de la saison des pluies. La crue peut modifier la population bactérienne en apportant des effluents dans les étangs.

III.3.2. Analyse de bars du même lieu mais issus d'aquariums différents

Il s'agit ici de tester l'hypothèse selon laquelle des poissons élevés dans des conditions différentes au même endroit sont susceptibles d'avoir des profils différents. Cet essai a été conduit dans les installations de l'IFREMER à Palavas dans deux aquariums possédant des circuits d'alimentation et de traitement de l'eau très différents. L'aquarium ASC est un circuit fermé alimenté par de l'eau de mer filtrée et recyclée en continu. Il s'apparente aux étangs de production piscicoles. L'aquarium C1 est un circuit ouvert alimenté avec de l'eau de mer pompée au même endroit que l'aquarium ASC, mais renouvelée en permanence. C'est un système ouvert assimilable à ce qui se passe en mer ou dans les nasses immergées.

Sur le gel de DGGE (Figure III.20.), on peut constater de 3 à 5 bandes. Les profils A1, A1' et A1'' sont des répétitions de l'analyse du même poisson. Les résultats montrent que pour un même poisson, les profils sont identiques et tous les poissons de l'aquarium ASC donnent des profils DGGE très proches. A l'opposé, les poissons issus de l'aquarium C1, donnent des profils différents tant au niveau du nombre des bandes que de leur positions.

L'analyse de similarité des profils DGGE (Figure III.21) confirme les observations précédentes. A 90% de similarité, 2 grands clusters sont observés, le premier contient les poissons de l'aquarium ASC et le deuxième contient les poissons de l'aquarium C1. Les poissons de l'aquarium ASC se regroupent dans un

même cluster avec 100% de similarité. Pour les profils des poissons de l'aquarium C1, des différences apparaissent avec un pourcentage de similarité variant de 92 à 96%. Il existe un marquage commun mais avec une variabilité dans l'aquarium C1 plus importante, sans doute due au renouvellement de l'eau qui modifie l'écosystème bactérien en fonction des apports d'eau de mer « fraîche ».

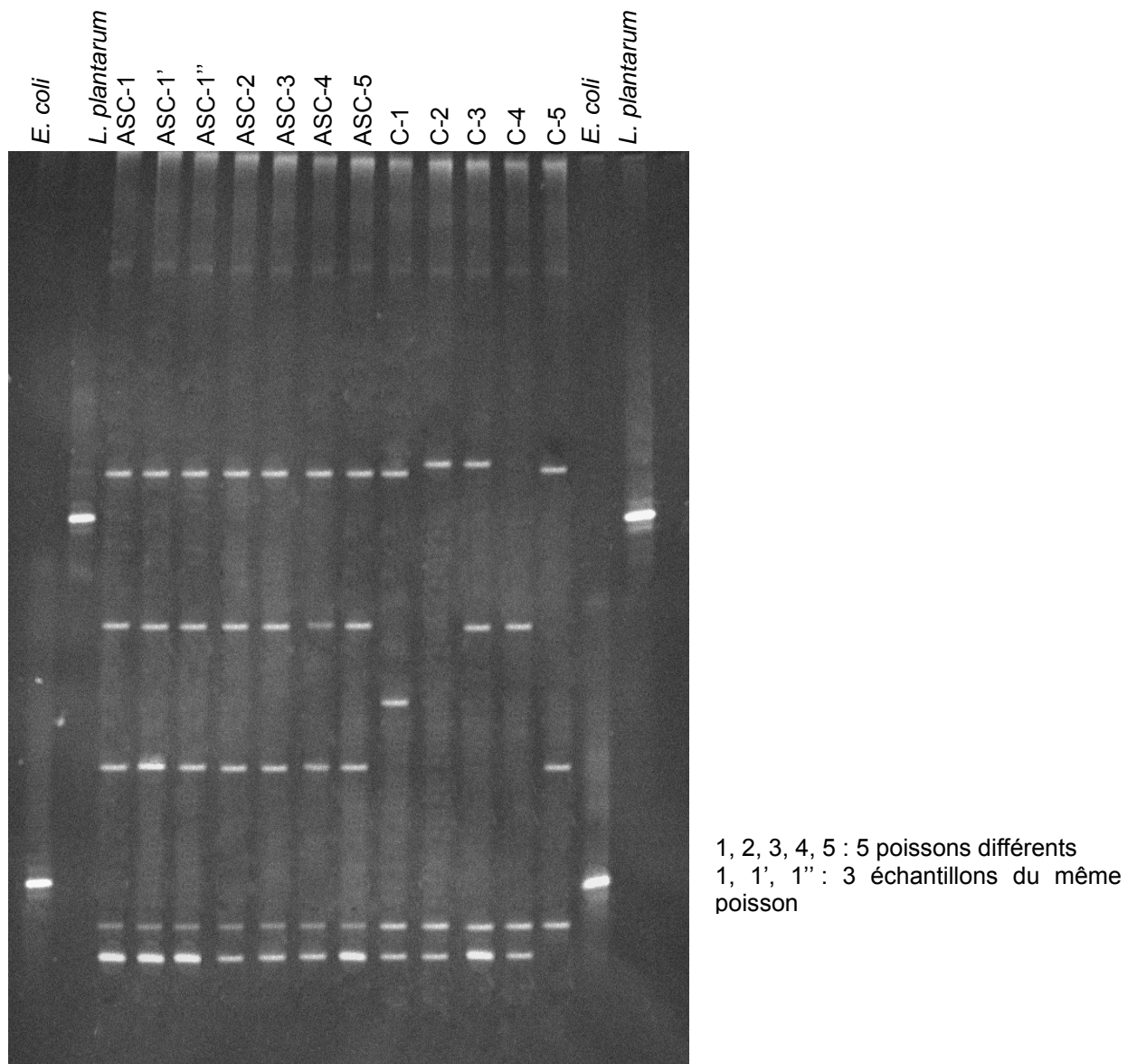


Figure III.20. : Photo de gel DGGE d'ADN bactérien extrait de bars capturés dans un aquarium alimenté par de l'eau de mer recyclée (ASC) et dans un aquarium alimenté par de l'eau de mer courante (C1) à la station IFREMER de Palavas.

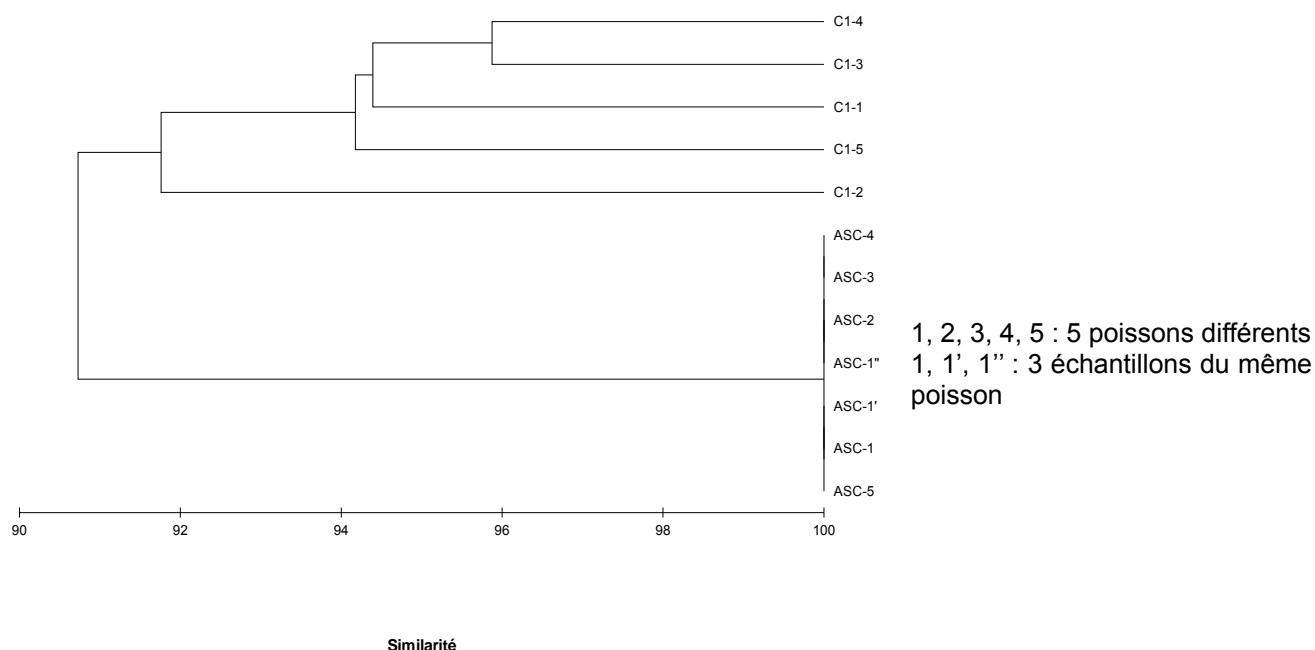


Figure III.21. : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN bactérien extrait de bars capturés dans un aquarium alimenté par de l'eau de mer recyclée (ASC) et d'un aquarium alimenté par de l'eau de mer courante (C1) à la station IFREMER de Palavas, Montpellier

III.3.3. Effet des traitements technologiques sur le marquage microbien

Les analyses réalisées jusqu'alors concernaient des poissons entiers non transformés alors que la grande majorité des poissons sont vendus après transformation, le plus souvent le filetage et la congélation qui sont réalisés le plus souvent localement en Asie. Nous avons voulu explorer la pérennité du marquage lors de différents procédés de transformation.

III.3.3.1. Effet des traitements de marinage, de séchage, de réfrigération et de filetage

Les traitements mis en œuvre sur des tilapias sont le marinage, une méthode de conservation populaire des poissons, le séchage à température élevée destinés à la fabrication de la farine de poisson, la réfrigération à 4°C et le filetage. La majorité des auteurs qui ont étudié l'influence d'un traitement technologique sur la résistance

d'un germe ou d'un groupe de germes particuliers, inoculent à fortes doses puis recherchent les germes ensuite en faisant varier les paramètres du traitement (Clavero et Beuchat, 1996 ; Ellajosyula *et al.*, 1998 ; Nascumento *et al.*, 1998).

Nous avons choisi de ne pas inoculer avec des souches microbiennes témoins nos poissons pour plusieurs raisons :

- ✓ cela impliquerait des problèmes d'ordre sanitaire lors de transformation comme le séchage (production d'aérosols) ;
- ✓ puisque nous souhaitons étudier l'influence de chaque traitement, il serait incohérent de faire subir en amont une stérilisation à nos poissons (comportement différents des tissus ensuite) ;
- ✓ on ne sait pas encore quel germe ou quels groupes de germes sont susceptibles d'être des marqueurs donc le choix d'un microorganisme particulier serait aléatoire ;
- ✓ Enfin, l'objectif du travail est de tracer un poisson quel qu'il soit avec sa charge microbienne naturelle. Une étude par inoculation par une bactérie d'intérêt pourra être envisagée lorsque les marqueurs auront été déterminés, ce qui donnera des renseignements sur leur possibilité de survie aux traitements technologiques.

Les résultats de DGGE d'ADN bactérien extrait de filets de Tilapias ayant subi le filetage, le marinage, le séchage et la réfrigération à 4°C sont représentés sur la figure III.22. Les profils de DDGE avant et après le filetage sont identiques, et on peut constater 9 bandes bien distinctes. Après le marinage et le séchage, une diminution du nombre de bandes est observée. A partir de 9 bandes au début, le nombre de bande diminue jusqu'à 5 pour les poissons ayant subis le marinage et jusqu'à 3 pour les poissons ayant subis le séchage. Par contre, il y a une augmentation du nombre de bandes jusqu'à 10 bandes pour les poissons réfrigérés à 4°C.

L'analyse de similarité confirme bien la différence observée pour les profils bactériens des poissons ayant subi les traitements technologiques (Figure III.23). Nous constatons que tous les filets non traités se retrouvent dans le même groupe avec 100% de similarité, et que les filets réfrigérés se regroupent dans le même cluster que les filets non traités avec 98% de similarité. De plus, avec 94% de similarité, on distingue 2 clusters : le premier cluster contient les filets non traités, les filets réfrigérés et les filets marinés ; le deuxième cluster contient les filets séchés.

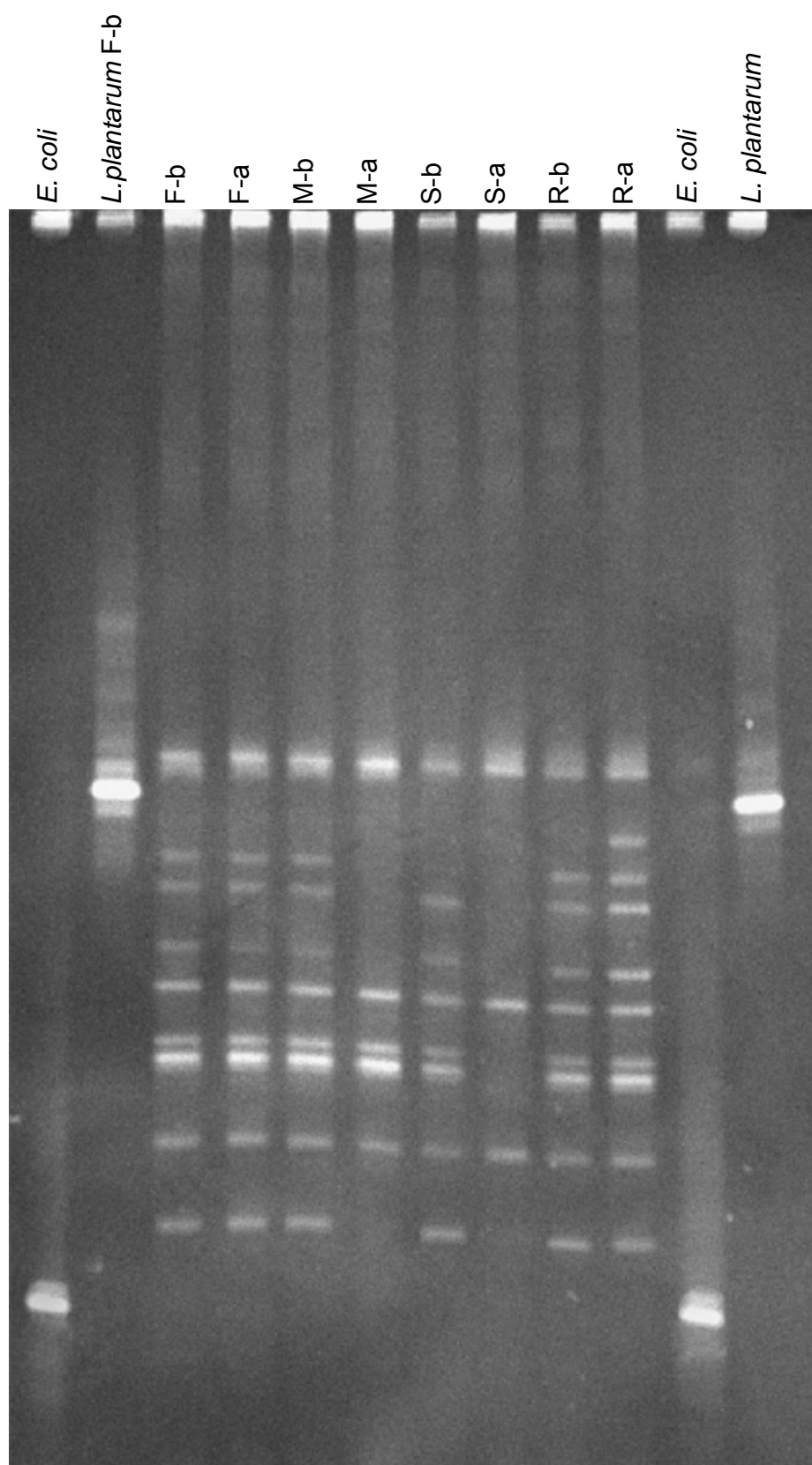


Figure III.22. : Photo de gel DGGE d'ADN bactériens extraits de filets de tilapias ayant subit des traitements.

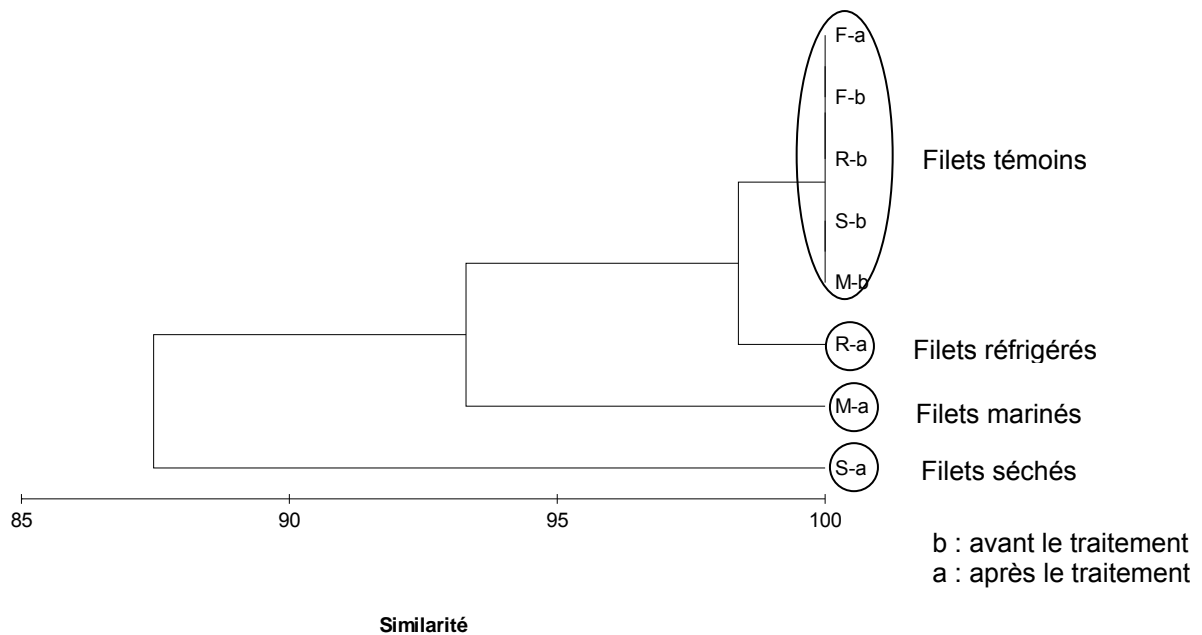


Figure III.23. : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN bactériens extraits de filets de tilapias ayant subi des traitements
F : le filetage ; M : le marinage ; S : le séchage ; R : la réfrigération à 4°C

Après le filetage, nous avons constaté qu'il n'y a pas d'évolution des flores microbiennes. Ceci peut être dû aux bonnes conditions sanitaires du filetage qui limite les contaminations qui se trouvent dès lors au-dessous du seuil de détection de la PCR-DGGE.

Le marinage a été réalisé selon la méthode de marinage rapide de Poligné et Collignan (2000). Ce procédé d'immersion rapide offre une bonne alternative aux techniques de marinage conventionnelles. Les poissons sont ainsi marinés rapidement pendant 60 min, au lieu de quelques jours selon le processus traditionnel. La solution contient une haute concentration en acide et en sel et elle est agitée, ce qui permet des transferts de masse optimaux en empêchant la formation d'une couche extérieure diluée sur les filets de poissons (Bohuon *et al.*, 1998). Après le traitement, le pH des filets atteint $3,85 \pm 0,1$. Avec cette méthode, Poligné et Collignan (2000) ont montré que les anchois marinés peuvent être conservés pendant 2 mois à 4°C sans développer de contamination. Après le marinage, il y a une diminution des bandes des profils DGGE (Figure III.22). Ce qui peut indiquer un effet destructif sur les flores bactériennes présentes sur les filets de poissons ou un effet sur l'ADN bactérien présent sur les filets qui est dénaturé donc difficilement extractible et amplifiable par PCR. Il a été montré que le traitement par un acide

cause la dépurination de l'ADN (Lindahl, 1993) et empêche l'amplification par PCR (Master *et al.*, 1994 ; Ma *et al.*, 1994). Cependant, un temps de traitement court peut être insuffisant pour détruire l'ADN (Prince et Andrus, 1992). Herman (1997) a montré qu'après un traitement avec 6,7% d'HCl pendant 5 min, l'ADN de *L. monocytogenes* peut encore être amplifié par PCR. Dans une autre expérience, *E. coli* et *L. monocytogenes* ont subi un traitement par HCl à pH 2 et sont encore détectés par PCR après 24h et 16h, respectivement (Master *et al.*, 1994).

Pour le séchage, nous avons choisi un séchage mettant en jeu une température élevée, soit 3 heures de séchage à 120°C. Après ce traitement, la teneur en eau des filets est de 16,5% \pm 1,5. Cette faible teneur permet une bonne conservation des filets (Oksuz *et al.*, 2008) mais est encore élevée pour la farine dont la teneur en eau varie de 7,2% à 15,5% (Kume *et al.*, 1983 ; Opstvedt *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2006). Après le séchage, un appauvrissement du profil DGGE est observé (Figure III.22). Cette diminution du nombre de bandes sur le gel témoigne de la destruction thermique des souches bactériennes initialement présentes sur les filets.

La résistance thermique dépend de la composition de la flore microbienne endogène des aliments. Les bactéries à Gram positif sont souvent plus sensibles à la chaleur que les bactéries à Gram négatif (Mossel *et al.*, 1995). La chaleur peut endommager l'ADN par des réaction de dépurination ou de désamination et, à température élevée, peut causer la scission de double brins et la perte irréversible de la structure secondaire de l'ADN (Pellon et Sinskey, 1984 ; Miles *et al.*, 1986). Cependant, lors de la PCR-DGGE, on peut encore observer quelques bandes preuve que tout l'ADN n'est pas dénaturé. Ce résultat est en accord avec l'étude de Master *et al.* (1994) qui ont montré qu'à 121°C, l'ADN est partiellement endommagé mais reste amplifiable par PCR. McKillip *et al.* (1999) ont également prouvé la stabilité de l'ADN d'*E. coli* après un traitement thermique à 60°C pendant 48h dans le lait. Nogva *et al.* (2000) ont montré qu'à 72°C, après 24h, l'ADN de *Campylobacter jejuni* peut encore être amplifié par PCR et qu'après un traitement à 100°C pendant 6h, on peut encore amplifier l'ADN, alors qu'après 24h, cette limite de détection est atteinte.

Concernant la réfrigération, les profils bactériens ont été réalisés après 2 semaines de conservation des filets à 4°C. L'observation du profil DGGE montre l'apparition d'une nouvelle bande et on peut également constater que l'intensité de

certaines bandes est plus élevée. On peut émettre l'hypothèse que certaines bactéries psychrophiles ou psychrotrophes peuvent se sont développées pendant la réfrigération. Fagan *et al.* (2003) ont signalé une augmentation de $1 \log_{10}$ UFC/g de la population bactérienne de filets de maquereaux et de $2 \log_{10}$ UFC/g de filets de saumons réfrigérés à 4°C après 3 jours. Patsias *et al.* (2008) ont également montré une augmentation de $4 \log_{10}$ UFC/g de la population bactérienne totale des filets de poulets après 9 jours de conservation à 4°C. Des *Listeria* et des *Pseudomonas* peuvent se développer durant la réfrigération (Farber et Peterkin, 1991 ; Coates *et al.*, 1995 ; Widders *et al.*, 1995).

III.3.3.2. Effet des répétitions de cycles de congélation-décongélation

Dans cette partie, nous avons étudié la persistance des bactéries des poissons lors de congélations et décongélation successives, événements qui peuvent survenir lors de la rupture de la chaîne du froid pendant le stockage et le transport. La congélation est le procédé qui permet la stabilisation en l'état d'origine d'un produit par un abaissement de température à -18°C à cœur. La durée de congélation augmentant proportionnellement au carré de l'épaisseur, les filets de poisson à traiter sont choisis les plus homogènes possibles.

La figure III.24. présente l'évolution de la température à cœur des filets de tilapias durant la répétition des cycles de congélation-décongélation. Les filets destinés à la congélation ont une température initiale similaire (environ 16°C). A partir du 2^{ème} cycle, après une décongélation par un douchage continu sous l'eau à 20°C environ, la température initiale des filets se trouve à 8°C. Le temps pour atteindre la température de consigne de la congélation de -18°C est de 22 min. Après 15 min de décongélation, la température. à cœur des filets atteint 8°C. A partir de cette température, on continue la répétition de congélation-décongélation pendant 14 cycles supplémentaires.

L'observation des courbes de congélation-décongélation (Figure III.24.) permet d'affirmer que l'ensemble des filets ont été correctement congelés et décongelés pendant les différents cycles. Le temps de congélation de 30 min et le temps de décongélation de 15 min sont suffisants pour atteindre les températures cibles pour la congélation et la décongélation.

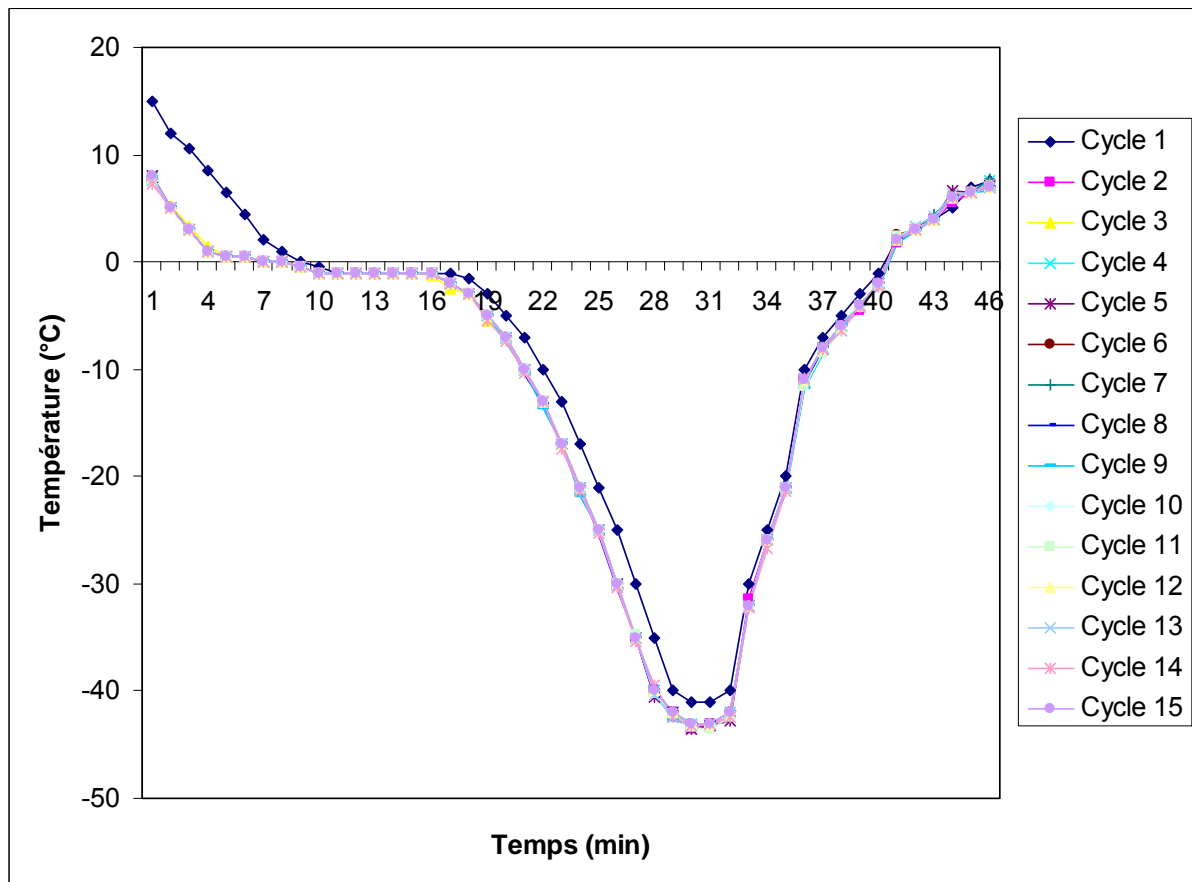


Figure III.24. : Évolution de la température à cœur des filets de tilapias lors de la répétition des cycles de congélation-décongélation.

Les courbes de congélation du poisson présentent trois phases successives. Tout d'abord, la température à cœur descend jusqu'à une température dite de congélation commençante (T_{cc}). Parce que le poisson est très riche en eau (90% à peu près), sa température de congélation commençante est comprise entre -1,65 et -2,2°C. A partir de cette valeur, les premiers cristaux de glace pure commencent à apparaître. Au fur et à mesure de leur apparition, les cristaux vont prélever de l'eau dans la matrice liquide, entraînant la cryo-concentration. Mais l'élévation de la teneur en matière sèche soluble dans la fraction non congelée entraîne une augmentation de la viscosité qui va freiner les phénomènes de diffusion, dont la cristallisation (Genin et René, 1994). C'est pourquoi on observe une descente en température relativement lente, correspondant à la cristallisation de l'eau. Elle est souvent appelée « pseudo pallier » de congélation, par analogie avec le pallier vrai observé au cours de la congélation de l'eau pure à 0°C. Après avoir passé ce pallier, la température descend rapidement jusqu'à -40°C après 30 min.

Les résultats de DGGE d'ADN bactérien extrait de filets de tilapias ayant les cycles de congélation-décongélation et la congélation en chambre froide (-20°C) sont représentés sur la figure III.25. Les profils DGGE des témoins et des filets ayant subis jusqu'à 10 cycles de congélation-décongélation, ainsi que des filets subis une conservation à la chambre froide (-20°C) pendant 3 semaines sont identiques. On peut observer 9 bandes bien distinctes pour tous les échantillons. Cependant, après 15 cycles de congélation-décongélation, le nombre de bandes diminue légèrement jusqu'à 7 bandes.

L'analyse statistique confirme bien que tous filets de poissons avant le traitement, ainsi que des filets qui ont subit 1, 5 ou 10 cycles de congélation-décongélation ainsi que les filets qui ont été conservés à -20°C pendant 3 semaines se retrouvent dans le même groupe statistique. Par contre, les filets ayant subit 15 cycles de congélation-décongélation se retrouvent dans un groupe à part (Figure III.26), ce qui est le signe de la modification du profil bactérien.

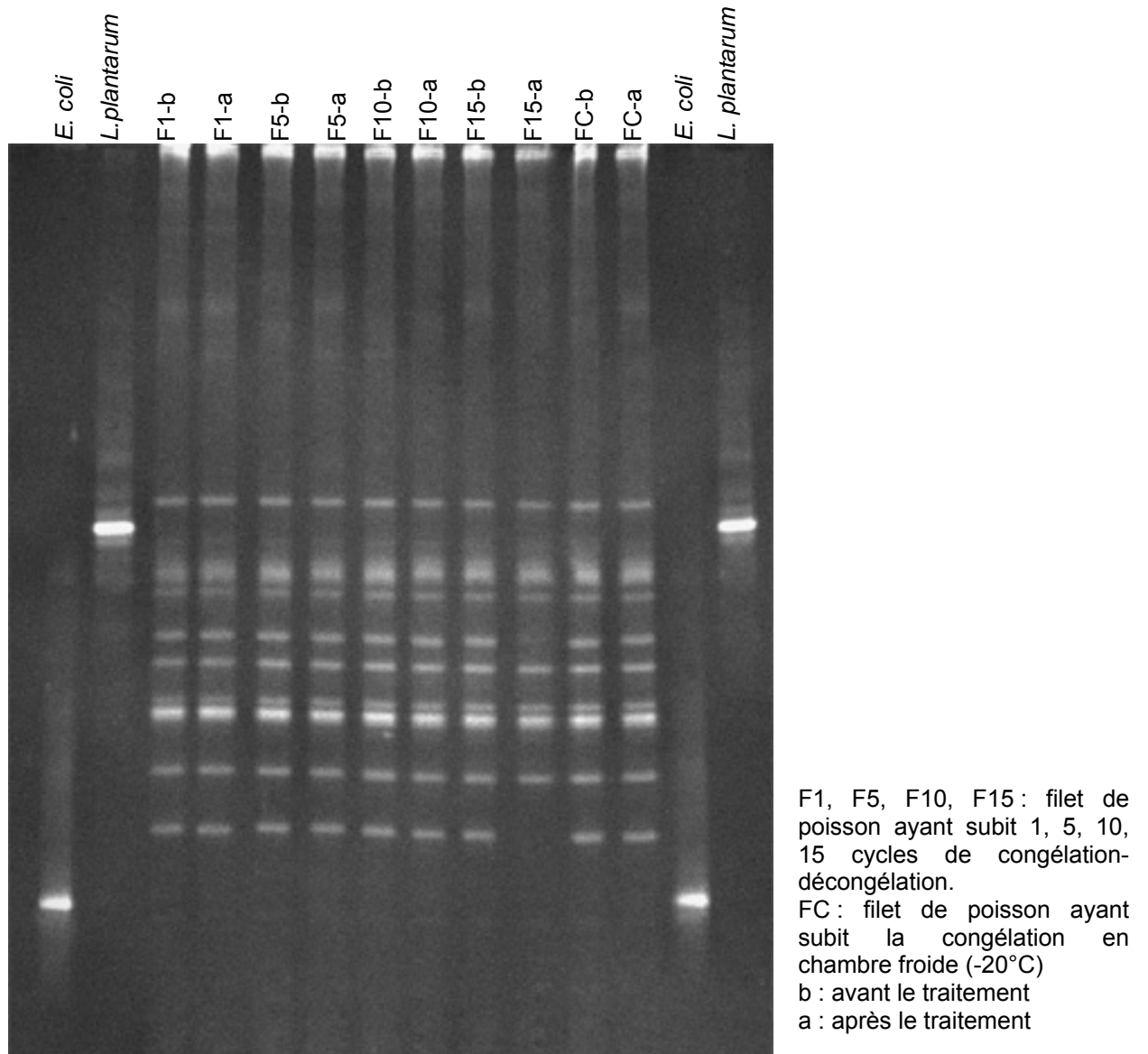


Figure III.25. : Photo de gel DGGE d'ADN bactériens extraits de filets de tilapias ayant subi la répétition des cycles de congélation-décongélation et la congélation en chambre froide (-20°C).

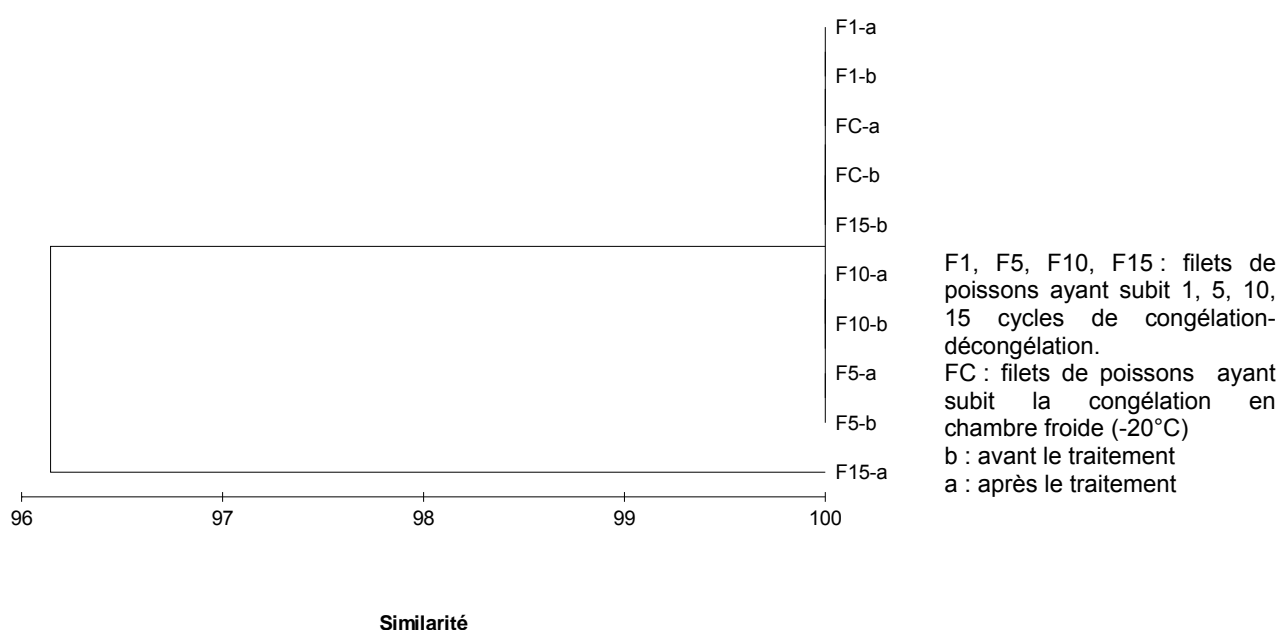


Figure III.26. : Dendrogramme des profils DGGE d'ADN bactériens extraits de filets de tilapias ayant subi la répétition des cycles de congélation-décongélation et la congélation en chambre froide (-20°C).

L'image du gel de DDGE montre de nombreuses bandes dans les profils, ce qui indique que les filets de poissons portent ou ont porté de nombreuses souches bactériennes alors que les filets sont supposés peu contaminés. Ceci s'explique par le fait que les filets ont conservé leur peau et que la peau des poissons a une charge microbienne importante.

Les effets de la basse température jouent sur le métabolisme des bactéries en réduisant les activités enzymatiques, la fluidité de leurs membranes, en modifiant le transport des aliments et des déchets, en diminuant les vitesses de la transcription, de la traduction et de la division cellulaire et en dénaturant certaines protéines (Goodchild *et al.*, 2004 ; Ratkowsky *et al.*, 2005). Ces modifications ne mettent pas en cause la viabilité des bactéries ou très peu.

Plusieurs facteurs ont été proposés pour expliquer les dommages provoqués aux micro-organismes par la congélation et la décongélation. Quand l'eau gèle, les éléments dissouts deviennent concentrés dans la fraction de l'eau non gelée dans laquelle les bactéries se trouvent. En conséquence, l'eau diffuse de la cellule microbienne vers la solution concentrée qui l'entoure.

Ainsi, les dommages pourraient être expliqués par des facteurs suivants (Geiges, 1996 ; El-Kest et Marth, 1992 ; Lund, 2000):

(1) Dommages mécaniques aux parois cellulaires et aux membranes cellulaires résultant de la formation de la glace extra et intracellulaire, (2) Déséquilibre en électrolyte résultant de la déshydratation et de la concentration accrue des solutés dues à la formation des glaces. Ce déséquilibre conduit à une perte d'eau de surface des protéines causant leurs dénaturations. Une autre possibilité est la réduction de l'agitation moléculaire qui conduit à un rapprochement des différentes protéines suivies de la formation de ponts disulfures anormaux, (3) Rétrécissement du volume des cellules au-dessous d'un volume critique minimum provoquant la rupture de leurs membranes.

Ces facteurs permettent d'expliquer les effets d'atténuation ou d'exacerbation qui affectent la survie des microorganismes pendant la congélation et décongélation comme la vitesse de congélation, la température du stockage, la composition des aliments à congeler, le stade de croissance du microorganisme et les espèces microbiennes différentes (Hanna *et al.*, 1982 ; Grecz et El-Zawahry, 1984). La congélation et le stockage à la température de congélation conduit à des dommages cellulaires qui s'accumulent avec le temps. A un certain point, les dommages deviennent irréparables et la cellule bactérienne succombe à la décongélation. Le processus de décongélation peut provoquer plus de dommages que la congélation. Ceci est dû à la fonte des cristaux de glace qui se sont développés pendant la congélation (El-Kest et Marth, 1992). Ceci se produit parce que la décongélation est plus lente que la congélation, et l'aliment reste ainsi plus longtemps à la température de sub-congélation, zone qui favorise la recristallisation quand les petits cristaux de glace fondent et se recongèlent en formant de grands cristaux de glace, et plus particulièrement si les mélanges eutectiques sont formés pendant la congélation (Potter, 1986).

Après des cycles de congélation-décongélation ou bien après une longue durée de congélation en chambre froide, on peut encore retrouver les profils bactériens chez des filets de poissons (Figure III.25). Une hypothèse est que dans la population bactérienne, il y ait quelques espèces qui ont la capacité de résister au froid. Afin d'expliquer la résistance au froid des bactéries, plusieurs études ont été menées. La température décroissante exerce un effet nuisible sur les propriétés

physiques et les fonctions des membranes, menant typiquement à une réduction de la fluidité des membranes. La composition en lipide régit les propriétés physiques des membranes et par conséquent il n'est pas étonnant que celle-ci varie avec l'adaptation thermique des microorganismes. Généralement, afin de résister au froid, les bactéries produisent plus d'acides gras insaturés, polyinsaturés et branchés, avec une proportion élevée d'acides gras cis-insaturés à double liaison. Ce changement de composition peut avoir un rôle principal en augmentant la fluidité des membranes (Russell, 1997 ; Chintalapati *et al.*, 2004).

Certaines protéines dites antigel ont la capacité de se lier aux cristaux de glace grâce à une grande surface et créaient de ce fait une hystérésis thermique qui permet d'abaisser la température à laquelle un microorganisme peut se développer (Jia et Davies, 2002). Les protéines antigel ont été récemment mises en évidence chez des bactéries issues de lacs de l'Antarctique (Gilbert *et al.*, 2004).

Le tréhalose et les exopolysaccharides pourraient également jouer un rôle important dans la cryoprotection des bactéries psychrophiles. Le tréhalose peut empêcher la dénaturation et l'aggrégation des protéines (De Virgilio, 1994; Phadtare, 2004). Des exopolysaccharides ont été trouvés à concentration élevée chez des bactéries marines antarctiques (Mancuso Nichols *et al.*, 2005a). Ils modifient l'environnement physico-chimique des cellules bactériennes, participent à la conservation de l'eau, favorisent la séquestration et les concentrations d'aliments, maintiennent et protègent les enzymes extracellulaires contre la dénaturation par le froid et agissent également en tant que cryoprotecteurs (Mancuso Nichols *et al.*, 2005b).

L'effet le plus important des températures basses est celui exercé sur la vitesse des réactions chimiques, la plupart des réactions baissent exponentiellement avec la décroissance de la température (Siddiqui *et al.*, 2004). Cependant, les bactéries psychrophiles produisent des enzymes adaptées au froid qui ont des activités spécifiques élevées à basses températures. L'hypothèse généralement acceptée pour cette adaptation au froid est la relation entre activité-stabilité-flexibilité, qui suggère que les enzymes psychrophiles augmentent la flexibilité de leur structure afin de compenser l'effet du froid (Johns et Somero, 2004).

La synthèse des protéines du stress thermique est l'une des principales réponses des microorganismes aux changements de température. Plusieurs protéines dites « cold shock » ont été trouvées chez des bactéries telles que *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* (Abee et Wounters, 1999 ; Panoff *et al.*, 2000).

Ces protéines peuvent être indispensables à la survie des bactéries durant le choc au froid et peuvent même être impliquées dans la croissance des bactéries lors de conditions plus favorables. Ces protéines sont synthétisées de manière temporaire ou permanente selon la réduction de la température de croissance (Berry et Foegeding, 1997 ; Panoff *et al.*, 1998 ; Phadtare *et al.*, 1999).

Récemment, le dommage oxydatif a été impliqué comme un mécanisme qui contribue au dommage cellulaire pendant la congélation-décongélation puisqu'on peut prévoir un effet oxydatif fort lors de la décongélation (Park *et al.*, 1998). La résistance à ce dommage oxydatif est renforcée par l'action des superoxyde dismutases (SOD). Il a été montré que les SOD jouaient un rôle important dans la résistance aux dommages dus à la congélation-décongélation chez *Campylobacter coli* (Stead et Park, 2000).

L'effet de la congélation sur les bactéries peut varier entre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. Lund (2000) a décrit la sensibilité de *Staphylococcus aureus*, à la congélation dans certaines matrices telles que le lait entier, le bœuf haché et le poulet. Généralement, quand un tel aliment a été congelé et stocké à une température entre -18°C et -22°C, une réduction logarithmique de 1 de la population de *S. aureus* a été observée après un temps de stockage de plusieurs mois. Une autre étude a comparé la survie de *S. aureus* dans la viande de bœuf à 2 pH différents. *S. aureus* soumis à une répétition des cycles de congélation-décongélation a montré un taux de survie plus faible à pH faible qu'à pH élevé (Demchick *et al.*, 1982). Dans notre cas, les poissons n'ont pas été traités, le pH reste encore élevé, cela peut entraîner une plus forte résistance des bactéries à l'effet des cycles de congélation-décongélation.

Certaines espèces bactériennes à Gram négatif peuvent survivre convenablement dans les aliments surgelés selon la nature de la matrice des aliments et d'autres facteurs.

Actuellement, il est évident que certains types de *Salmonelles*, peuvent faire partie de la flore microbienne indigène en aquaculture tropicale. Il est bien établi que les oiseaux et les eaux d'égouts puissent propager des *Salmonelles* et d'autres microbes pathogènes humains dans l'environnement (Huss *et al.*, 2000). Les espèces de *Salmonella* spp. sont connues pour leur tolérance à la congélation. *Salmonella typhimurium* est très stable sur des poissons congelés à -22°C et stockés à -17,9°C pendant plus d'un an, seulement 1 réduction logarithmique a été observée

(Raj et Liston, 1961). *Salmonella typhimurium* est également résistante à la congélation et au stockage à -20°C dans la viande de bœuf hachée, ainsi qu'à la répétition de cycles de congélation-décongélation pendant une période de 3 mois. La résistance de cette bactérie aux effets mortels de la répétition des cycles de congélation-décongélation est probablement due à l'effet protecteur des molécules complexes des aliments (Georgala and Hurst, 1963). Sur des ailes du poulet ayant subi un traitement de 5 répétitions de cycles de congélation-décongélation, peu de *S. typhimurium* ont survécu quand le processus a été couplé avec un traitement par de l'acide lactique à 5% (Olson *et al.*, 1981).

Lee *et al.* (1998) ont montré que *Campylobacter jejuni* est resté viable sur la peau de poulet stockée à -20°C et à -70°C pendant 14 et 56 jours, respectivement. Chan *et al.* (2001) ont étudié la résistance aux basses températures de diverses souches de *C. jejuni* prélevées dans une clinique et un élevage de volaille. Ces études ont montré qu'il y avait une variabilité substantielle parmi les souches de *C. jejuni* quant à leur résistance à la réfrigération à 4°C et à la congélation à -20°C.

Les espèces de *Vibrio* sont des pathogènes alimentaires majeurs. Un niveau élevé de *Vibrio* dans les produits de la mer est fonction d'une contamination de l'environnement aquatique. *Vibrio parahaemolyticus* est fréquemment isolé dans divers produits de la mer de différents pays (Wong *et al.*, 1999 ; Gooch *et al.*, 2002 ; Basti *et al.*, 2006). Les espèces de *Vibrio* spp. sont très sensibles aux effets létaux de la congélation. La soumission des huîtres aux températures de congélation a causé une réduction logarithmique de la population microbienne de 2 à 5 selon la charge initiale et la température de stockage (Parker *et al.*, 1994 ; Cook, 1997). Les études sur *Vibrio parahemolyticus* ont souligné l'importance de la charge initiale des bactéries sur la survie après congélation. Muntada-Garriga *et al.* (1995) ont prouvé qu'à la charge initiale de 10^7 CFU/mL dans les huitres, après une soumission à la congélation rapide puis stockage à -24°C, *Vibrio parahemolyticus* était viable après 18 semaines de stockage, tandis qu'avec une charge initiale de 10^5 UFC/mL ou moins, aucun survivant ne pourrait être détecté.

Notre étude est cohérente avec le travail de Geiges (1996) qui a étudié la réduction de la population d'*Escherichia coli* dans différents milieux pendant les cycles répétés de congélation-décongélation et de stockage court à -22°C. Cette expérience a montré que la réduction varie selon le milieu utilisé. Après 4 cycles de congélation-décongélation et une durée de stockage de 4 semaines à -22°C, la

population initiale ($1,65 \times 10^7$ UFC/mL) dans les différents milieux (H_2O , NaCl 0,1%, saccharose 10% et lait entier) a diminué à $7,5 \times 10^4$; $1,7 \times 10^5$; $2,5 \times 10^6$ et $3,3 \times 10^6$ respectivement.

Notre étude est également en accord avec celle de Sage et Ingham (1998) qui ont aussi montré l'effet de cycles de congélation/décongélation sur la survie d'*E. coli* sur la viande de bœuf. La congélation est réalisée à $-20^\circ C$ pendant 24h. La décongélation est réalisée selon plusieurs méthodes : $4^\circ C$ pendant 12h ; $23^\circ C$ pendant 3h ; ou chauffage microonde à 700W pendant 120 sec. Les auteurs ont montré qu'il y a une grande variété de sensibilité à la congélation - décongélation parmi les souches d'*E. coli* et qu'il n'y a pas de méthode de décongélation plus efficace pour détruire ces bactéries.

Notre étude utilise la congélation rapide qui peut créer moins de dommage aux cellules de bactéries que la congélation lente. Après la répétition des cycles de congélation-décongélation, une partie de la population microbienne est détruite à cause des effets du froid. Cependant, l'ADN peut persister et être retrouvé longtemps après que les microorganismes viables aient disparus (Master *et al.*, 1994 ; Deere *et al.*, 1996) et on peut encore révéler leurs profils par PCR-DGGE. Le scénario décrit par plusieurs auteurs est le suivant : les bactéries mortes s'autolysent, et il en résulte une fragmentation de leur paroi membranaire, dégageant le contenu cytoplasmique, y compris l'ADN. Ensuite, l'ADN est dégradé par les nucléases telles que les DNases (Bej *et al.*, 1991 ; Palmen et Hellingwerf, 1995). La vitesse de dégradation de l'ADN dépend de la nature des échantillons et des conditions de stockage (Wolffs *et al.*, 2005).

Quoiqu'il en soit, après 15 cycles de congélation-décongélation, les souches ou les ADN de certaines bactéries sont fortement endommagés et leur révélation s'avère impossible par PCR-DGGE.

III.3.3.3. Evolution des profils DGGE microbiens lors de transformation en filet de Pangasius dans une usine au Vietnam.

Nous avons montré que le profil de PCR DGGE de poissons était en relation avec les zones géographiques et les conditions d'élevage, ce qui répondait à notre hypothèse que les flores bactériennes des zones de productions permettaient le marquage d'origine des poissons. Or la plupart des poissons sont vendus transformés en filets congelés avant la distribution dans les pays d'exportation. Cette

transformation est largement réalisée dans des unités locales de taille plus ou moins grandes dans des conditions qui peuvent modifier le marquage d'origine des poissons. Nous avons voulu savoir si le marquage d'origine est modifié/altéré ou non par les ateliers de transformation.

Au cours de cette étude, le rendement moyen de transformation en filet pour le poisson entier *Pangasius* est de 34% à 40%. Ce rendement est assez bas comparé à celui obtenu avec les salmonidés ou les cyprinidés ; en revanche, il est comparable aux rendements de filetage obtenus chez d'autres poissons-chats : Channel catfish *Ictalurus punctatus* : 36 à 37% ; poisson-chat africain *Clarias gariepinus* : 31 à 47% et poisson-chat européen *Silurus glanis* : 38 à 43% (Fauconneau et Laroche, 1995).

Les résultats de l'analyse par DGGE d'ADN bactérien extrait de poissons au cours de leur transformation en filets sont présentés dans la figure III.27. On peut constater une diminution du nombre de bandes au cours de transformation. De 8 bandes présentes au début pour le poisson entier, il n'en reste que 3 pour les filets en fin de transformation. Aucune nouvelle bande n'apparaît sur le gel de DGGE pour les échantillons analysés lors du traitement. Il y donc un appauvrissement du marquage lors du traitement. Le séquençage des bandes présentes sur le gel de DGGE a permis d'identifier les souches présentes (Tableau III.2). Le tableau III.3. donne l'évolution de la présence de ces différentes souches bactériennes lors de la transformation.

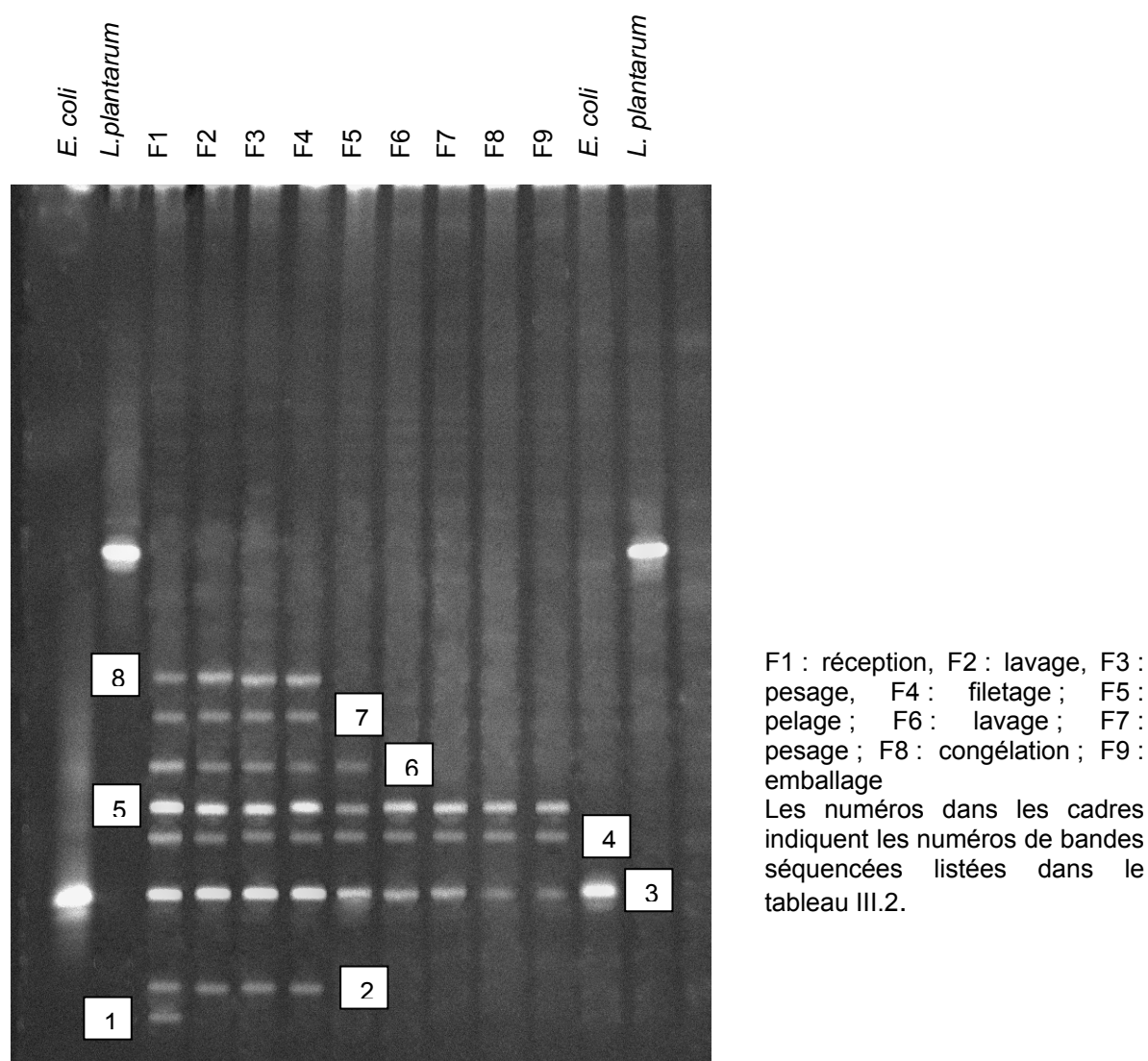


Figure III.27. : Photo de gel DGGE d'ADN bactérien extrait de *Pangasius* lors de transformation en filet, dans une usine au Vietnam.

Tableau III.2. : Noms des souches bactériennes détectées par PCR-DGGE au cours de la transformation de *Pangasius* en filet dans une usine au Vietnam.

Bandes n°	Identité des souches bactérienne selon GenBank	Similarité* (%)	N° d'accension
1	<i>Enterobacter hormachei</i>	95%	EF428236
2	<i>Pantoea agglomerans</i>	96%	DQ481474
3	<i>E. coli</i>	97%	EU014689
4	<i>Pseudomonas</i> sp	96%	EU741649
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	90%	DQ768706
6	<i>Stenotrophomas maltophilia</i>	96%	EU834266
7	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	98%	U96929
8	<i>Acinetobacter</i> sp.	97%	AM269521

* : % de similarité avec la souche de référence (N° d'accension cité)

Tableau III.3. : Evolution de la présence des bactéries sur les filets de *Pangasius* au cours de sa transformation.

	Réception	Lavage	Pesage	Filetage	Pelage	Lavage	Pesage	Congélation	Emballage
<i>Enterobacter hormachei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas sp</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter sp.</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-

+: présence
-: absence

Sur les *Pangasius*, nous avons retrouvé des souches appartenant à des espèces déjà détectées sur les *Pangasius* vietnamien capturés dans 5 fermes de la région d'An Giang. La diversité des bactéries est moindre ici ce qui s'explique par le fait que pour cet essai, nous avons travaillé avec de l'ADN extraits des filets de poissons non pelés alors que dans l'expérience précédente, nous avons étudié la population bactérienne d'un mélange de peau, d'ouïes et d'intestin. Malgré l'absence dans l'échantillon de morceaux d'intestins, la proportion de souches bactériennes entériques reste importante dont *E. coli*. Les étapes de lavage et de pelage ont un effet majeur sur la disparition des marqueurs, puisque on ne retrouve plus que 3 bandes sur 8 après ces étapes. Seules les bandes correspondantes à *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas sp.* persistent en fin de traitement et sont détectées dans les filets congelés. La disparition des souches à la surface des filets peut être due au pelage des poissons mais aussi au traitement à l'eau de javel. L'eau de Javel fournit de l'hypochlorite de sodium qui dissous dans l'eau conduit à deux molécules : l'acide hypochlorite (HOCl) et le moins actif l'ion hypochlorite (OCl⁻). Ces deux substances formeront du chlore libre quand ils agissent ensemble, provoquant une désinfection efficace. Les membranes des cellules des microorganismes pathogènes sont négativement chargées naturellement. En tant que telles, elles peuvent être pénétrées par l'acide hypochlorite neutre, plutôt que par l'ion hypochlorite négativement chargé. Les deux substances pénètrent les membranes des cellules des microorganismes et échangent des atomes avec d'autres composés, tels que les enzymes. Lorsque l'enzyme vient en contact avec le chlore, un ou plusieurs atomes d'hydrogène de la molécule sont remplacés par le chlore. Ceci va modifier la structure entière de la molécule et dans la plupart des cas

provoquer sa dissociation ou sa désactivation. Lorsque les enzymes ne fonctionnent pas correctement, la bactérie meurt (McDonnell et Russell, 1999). Bien que le chlore fonctionne bien à température froide et tolère l'eau calcaire, l'efficacité du chlore est réduite si le pH de la solution est élevé (Huss, 2003).

L'hypochlorite de sodium est largement utilisé pour contrôler les microorganismes dans les usines halieutiques au Vietnam, ceci est dû à son faible coût, sa facilité d'application et sa capacité d'inactiver une grande variété de microorganismes. Cependant, ce système de désinfection a plusieurs inconvénients comme la corrosion, la formation de sous-produits dangereux et la découverte de microorganismes pathogènes relativement résistants au chlore (Greene *et al.*, 1993).

L'efficacité d'un désinfectant est altérée par de nombreux facteurs. Les matières organiques et inorganiques peuvent concurrencer les bactéries réduisant l'action du désinfectant (Lambert et Johnston, 2001) ou peuvent former une barrière spatiale de sorte que les microorganismes soient protégés contre l'effet des désinfectants (Lambert et Johnston, 2001). Les autres facteurs qui peuvent influencer l'efficacité du désinfectant sont le temps de contact, la température et la concentration en désinfectant. La plupart des désinfectants sont formulés pour réduire la population bactérienne par au moins 5 réductions logarithmiques en 5 min de contact (Holah, 1995). Cependant, la relation entre le temps et l'efficacité dépend du type de microorganismes (Bessems, 1998) et de la température. Taylor *et al.* (1999) ont ainsi montré qu'à 20°C, 13 des 18 désinfectants testés étaient efficaces sur *Pseudomonas aeruginosa*, alors qu'à 10°C, seulement 11 désinfectants ont prouvé leur efficacité.

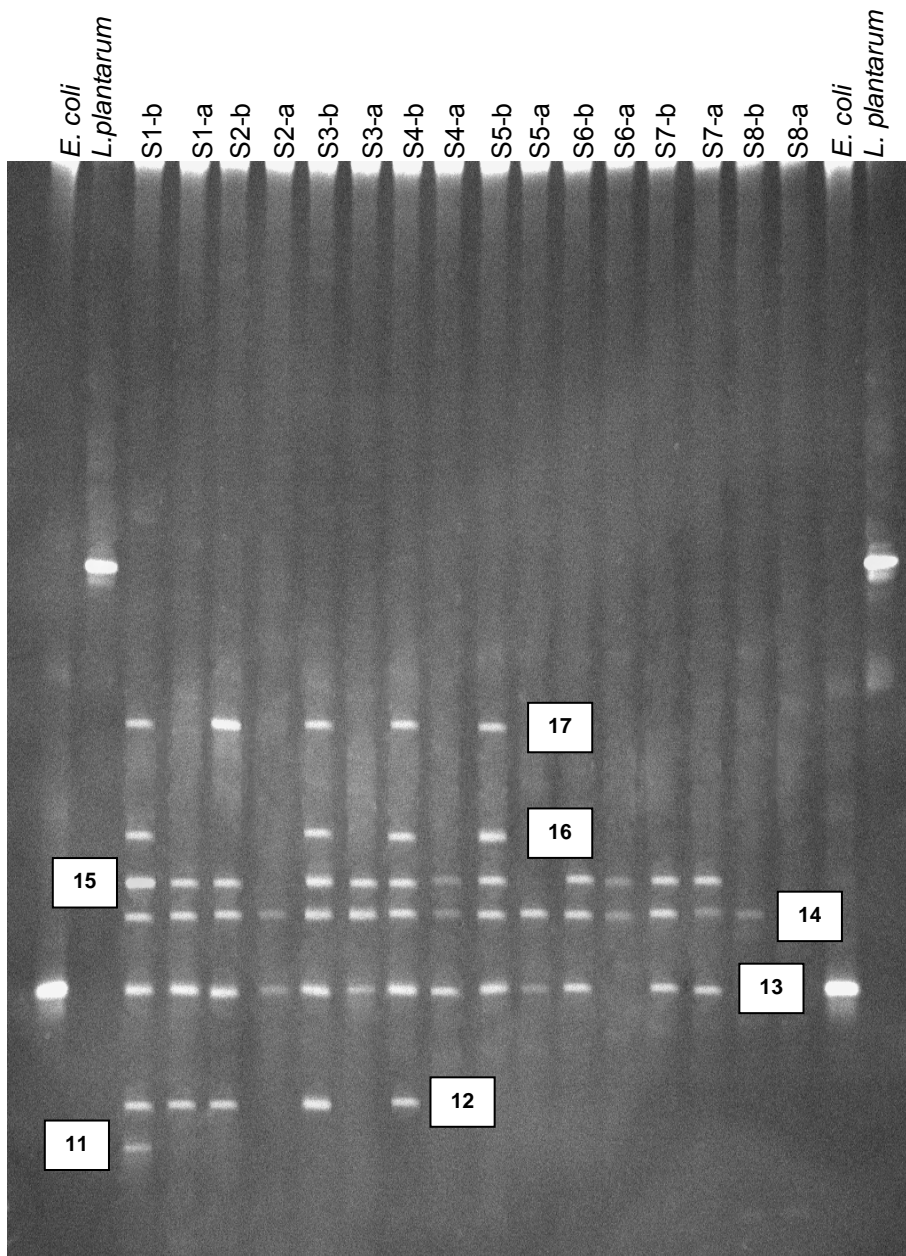
Le rapport entre la mort bactérienne et la concentration de désinfectant n'est pas linéaire, mais suit une courbe sigmoïdale biologique (Bessems, 1998). Tuncan (1993) a indiqué que l'efficacité du chlore sur *Listeria* sp. était augmentée quand la concentration est augmentée de 50 à 200 ppm. Cependant, dans le cas de l'usine où ont été réalisées nos expériences, il semble difficile d'augmenter la concentration en désinfectant actuelle (50 ppm) en raison du risque de retrouver des résidus dans les produits finis.

Concernant la pérennité de l'ADN de bonne qualité, il est reconnu que le mécanisme de destruction de l'ADN des bactéries par l'hypochlorite de sodium est probablement multifactoriel. Il a été montré que pendant le traitement, les bases et les nucléotides sont détruits, dans certains cas avec la formation de dérivés chlorés,

comme par exemple le 5-chlorocytidine (Hayatsu *et al.*, 1971). Le résultat final est la déstabilisation et la destruction de la structure spirale de l'ADN. Prince et Andrus (1992) ont démontré qu'un agent de blanchiment commercial contenant de l'hypochlorite de sodium à 0,5% était suffisant pour éliminer des traces d'ADN dans un laboratoire de biologie moléculaire. Cependant, d'après Herman (1997), les cellules de *Listeria monocytogenes* restent détectables par la PCR après un traitement avec la même concentration d'hypochlorite de sodium. Ceci peut être expliqué par une protection de l'ADN par des structures intactes de la paroi bactérienne.

Les souches persistantes tout au long du traitement sont connues pour être sensibles à l'eau de javel et aussi aux désinfectants mais elles sont aussi capables de former des biofilms qui peuvent les abriter. Le pouvoir antibactérien de l'eau de javel dépend des conditions d'utilisation. L'eau de javel n'est efficace qu'en l'absence de traces de produits biologiques donc après un nettoyage efficace. Il est donc possible que ces souches résistent au nettoyage et à la désinfection et permettent malgré le faible nombre de bandes de marquer l'origine des poissons.

Les résultats de la PCR-DGGE de l'ADN extrait des prélèvements de la surface des équipements de l'usine au cours de transformation et après nettoyage et désinfection sont présentés dans la figure III.28. On observe que 7 bandes sont obtenues à partir des prélèvements réalisés sur les équipements utilisés en début de la transformation et que ce nombre diminue pour s'annuler pour les prélèvements réalisés sur la bande de convoyage.



S1 : réception, S2 : table de lavage, S3 : panier de pesage, S4 : table de filetage, S5 : table de pelage, S6 : table de lavage, S7 : panier de pesage, S8 : bande du convoyeur
B : au cours de transformation, A : après nettoyage et désinfection.
Les numéros dans les cadres indiquent les numéros de bandes séquencés correspondant au tableau III.4

Figure III.28. : Photo de gel DGGE d'ADN bactérien extrait des prélèvements réalisés sur les équipements de transformation.

A partir du gel de DGGE, les bandes observées ont été prélevées, amplifiées et séquencées pour identifier les souches présentes sur les équipements. L'identité des souches est donnée dans le tableau III.4.

Tableau III.4. : Noms des souches bactériennes présentes sur la surface des équipements utilisés pour la production de filets de poissons-chats *Pangasius* au Vietnam.

Bandes n°	Identité des souches bactérienne selon GenBank	Similarité* (%)	N° d'accession
11	<i>Enterobacter hormaechei</i>	98%	EF428236
12	<i>Enterobacter agglomerans</i>	97%	DQ481474
13	<i>Escherichia coli</i>	97%	EU014689
14	<i>Pseudomonas sp.</i>	98%	EU741649
15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98%	DQ768706
16	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	98%	EU834266
17	<i>Acinetobacter sp</i>	98%	AM269521

* : % de similarité avec la souche de référence (N° d'accession cité)

Le séquençage confirme que ces bandes correspondent à des souches proches de celles isolées des filets de poisson. Sur la table de réception, on retrouve les 7 souches appartenant aux mêmes espèces bactériennes que celles détectées sur les filets de poisson. L'espèce de *B. vietnamiensis*, détectée sur les filets, n'est pas retrouvée sur les équipements, ceci est peut être du à l'échantillonnage ou à la présence minoritaire de cette souche dont l'ADN n'est pas révélé par la PCR-DGGE. Le nombre de souches différentes sur les équipements diminue au cours de la transformation, comme sur le filet de poisson. La diversité bactérienne sur la surface de découpe et dans le bac de réception est moindre que celle des filets. Le lavage et la désinfection de la surface après la transformation en filets réduisent donc le nombre de souches. Cependant, il reste encore après désinfection des bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas sp.* et *E. coli*. (Tableau III.5).

Tableau III.5. : Evolution de la présence des bactéries à la surface des équipements de transformation au cours du filetage et après le nettoyage et la désinfection.

Groupe	Réception		Table de lavage		Panier de pesage		Table de filetage		Table de pelage		Table de lavage		Panier de pesage		Bande du convoyeur	
	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A
<i>Enterobacter</i> sp	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. agglomerans</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>S. maltophilia</i>	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter</i> sp.	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-

B : au cours de la production

A : après nettoyage et désinfection

+: présence

- : absence

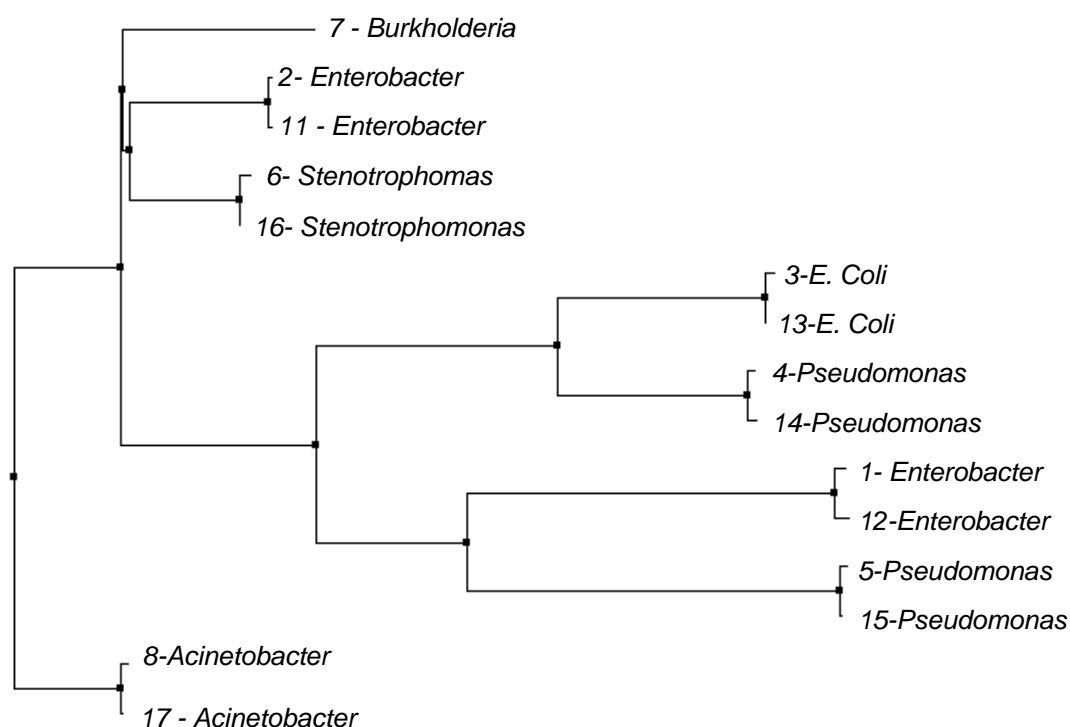


Figure III.29. : Dendrogramme de comparaison des séquences de toutes les bandes présentes sur les gels de DGGE réalisés avec les échantillons de filets de *Pangasius* ou des prélèvements de surface des équipements (1 à 8 : DGGE filets, 11 à 17 DGGE prélèvements de surface).

Dans les industries agroalimentaires, la contamination des aliments par des microorganismes peuvent avoir différentes origines parmi lesquelles on peut citer l'air, l'eau, le personnel et les surfaces de travail. La qualité microbiologique de l'air et de l'eau ainsi que l'hygiène du personnel pouvant être maîtrisées, la contamination des produits se fait essentiellement par l'intermédiaire des surfaces (Garry *et al.*, 1995). L'adhésion des micro-organismes aux surfaces métalliques est un phénomène physico-chimique, fréquemment rencontré en industries agroalimentaires (Boulange-Petermann *et al.*, 1995). Les microorganismes des surfaces peuvent être transférés au produit alimentaire directement par contact ou par des vecteurs tels que le personnel, les parasites, ou les procédures de nettoyage (Mafu *et al.*, 1990 ; Blackman et Frank, 1996 ; Miettinen *et al.*, 1999). Certaines bactéries pathogènes ou d'altération peuvent adhérer aux surfaces en contact avec l'aliment (Fonnesbech Vogel *et al.*, 2001) et rester viables même après le nettoyage et la désinfection (Frank et Koffi, 1990). Certaines de ces bactéries produisent des exopolymères, matériau de base de nombreux biofilms, qui peuvent faciliter la préservation des bactéries pathogènes à la surface des matériaux (Sasahara et

Zottola, 1993). La majorité des études sur la biodiversité des flores microbiennes dans les ateliers agro-alimentaires se concentre sur des bactéries pathogènes spécifiques comme *Listeria monocytogenes* (Destro *et al.*, 1996 ; Giovannacci *et al.*, 1999), ou des bactéries d'altération comme *Pseudomonas* spp (Michiels *et al.*, 1997). Pendant le processus industriel, les *Pangasius* sont éviscérés, pelés, filetés, congelés et emballés. Ces étapes de transformation peuvent propager la flore microbienne de la peau et de l'intestin sur les surfaces de travail, et ainsi contaminer les produits transformés tels que les filets de poissons. La peau des poissons-chats est une source importante de contamination bactérienne pendant le traitement (Kim et Marshall, 2000). Andrew *et al.* (1977) ont rapporté que des souches de *Salmonelles* ou appartenant au genre *Erwdasiella* ont été isolées des filets de poissons-chats vendus au détail. D'autres bactéries pathogènes, telles que *L. monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* ont été également isolées de filets (Wang et Silva, 1999) et sur des équipements de transformation de poissons-chats (Cotton et Marshall, 1998).

La contamination microbienne des surfaces en acier inoxydable a déjà fait l'objet de plusieurs études. L'adhésion bactérienne aux surfaces métalliques est peut être due à l'hydrophobicité de la surface bactérienne (Little *et al.*, 1986 ; Vanhaecke *et al.*, 1990) et des polysaccharides associés à la paroi bactérienne (Herald et Zottola, 1988) ainsi qu'à des effets de mouillabilité de la surface solide (Boulangé-Petermann *et al.*, 1993). Plus particulièrement, sur les surfaces en acier inoxydable, les solutions chlorées utilisées pour le nettoyage induiraient des changements sur la surface bactérienne, ce qui modifierait les mécanismes d'adhésion (Stanley, 1983 ; Vanhaecke *et al.*, 1990).

L'usine vietnamienne utilise une procédure de nettoyage avec un désinfectant à basse pression suivi d'une désinfection avec une solution d'hypochlorite de sodium à 200 ppm. Cependant, l'effet du lavage des différents matériels n'est pas aussi évident que l'on pourrait le penser et certaines espèces persistent et sont retrouvées comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* spp et *E. coli*, qui sont des bactéries à Gram négatif. Notre résultat est en accord avec le travail de Guðbjörnsdóttir *et al.* (2005) qui ont trouvé dans une usine de transformation de filets de poissons que les espèces dominantes attachées à la surface des matériaux étaient des Entérobactéries et des *Pseudomonas* sp. Bagge-Ravn *et al.* (2003) ont également montré que la majorité des bactéries qui restent à la surface après le

nettoyage et la désinfection étaient les bactéries à Gram négatif. Les espèces dominantes sont des *Pseudomonas* spp., *Neisseriaceae* et *Acinetobacter* spp.

Les *Pseudomonas* spp. sont généralement identifiées comme un contaminant fréquent des surfaces métalliques (Mayer et Zinner, 1985 ; Costerton *et al.*, 1987). Les *Pseudomonas* spp sont résistantes au stress du aux désinfectants (Anderson *et al.*, 1990; Grobe *et al.*, 2001; Wirtanen *et al.*, 2001). Elles peuvent adhérer facilement à la surface des matériaux et former des biofilms (Kharazmi *et al.*, 1999; Heydron *et al.*, 2000). Stanley (1983) a aussi étudié la fixation irréversible de *Pseudomonas aeruginosa* à la surface de l'acier. Il a trouvé que lorsqu'elles viennent en contact avec de l'acier, les cellules commencent à adhérer en moins de 1 min et le nombre augmente avec le temps. L'hydrophobicité de la surface bactérienne est à l'origine du phénomène (Stanley, 1983 ; Vanhaecke *et al.*, 1990).

E. coli est souvent résistante à la procédure de traitement (Craun, 1991). Elle peut également résister au traitement à l'eau chlorée (Dukan et Touati, 1996 ; Momba *et al.*, 1999). La capacité d'adhésion à la surface de l'acier inoxydable d'*E. coli* a été montré par Faille *et al.* (2002). Ils ont trouvé que *E. coli* peut former un biofilm pour résister à la procédure de nettoyage. Il y a également dans le cytoplasme d'*E. coli* des protéines responsables de la formation des flagelles (Landini and Zehnder, 2002) et de la formation des pilis (poils) qui permettent l'adhésion lors d'un changement de l'environnement (Leathart et Gally, 1998). L'adhésion par les pilis permet aux bactéries de se déplacer et d'adhérer à la surface (Peek *et al.*, 2001), tandis que la fixation par les flagelles est impliquée au début de l'adhésion des cellules mais ne semble pas être indispensable ensuite (Vatanyoopaisarn *et al.*, 2000).

Une autre raison expliquant l'inefficacité du désinfectant est la présence de la matière grasse. Le *Pangasius* est un poisson gras et on observe toujours au cours de sa transformation une couche de matière grasse à la surface des matériaux pouvant protéger spatialement les cellules bactériennes. Taylor *et al.* (1999) ont également montré que sous de mauvaises conditions sanitaires, l'hypochlorite de sodium à 500 ppm n'est pas assez efficace pour désinfecter *P. aeruginosa* et *E. coli*. Bessems (1998) montre également que l'utilisation de désinfectant peut être réduite si les conditions sanitaires sont meilleures. A partir de nos résultats, on pourrait conseiller de réaliser correctement le nettoyage de la graisse et ainsi favoriser l'efficacité de l'hypochlorite de sodium.

Dans notre étude, ce type de contamination est possible mais on peut penser que la PCR-DGGE ne soit pas assez sensible pour les détecter. La limite de détection de cette méthode est dépendante des espèces considérées et oscille entre 10^2 - 10^5 UFC/mL (Temmerman *et al.*, 2003 ; Fasoli *et al.*, 2005 ; Silvestri *et al.*, 2007). Dans une étude sur la flore de détérioration du flétan au cours de la conservation, Hovda *et al.* (2007a) ont montré que la PCR-DGGE permet de détecter la population bactérienne au niveau de $10^{1,3}$ UFC/g. Plusieurs études différentes ont montré que les populations bactériennes qui composent 1% ou plus de la communauté totale peuvent être détectées par PCR-DGGE (Muyzer *et al.*, 1993 ; Murray *et al.*, 1993). Quoiqu'il en soit, la figure III.29 montre le dendrogramme réalisé en comparant les séquences de chacun des produits de la PCR qui constituent les bandes du gel de DGGE pour les filets de poissons et pour les surfaces des équipements de l'usine. Les séquences sont très proches et laissent penser qu'il s'agit des mêmes souches ou de souches très proches. La réamplification des bandes découpées sur le gel de DGGE et la précision du séquençage pourrait expliquer ces faibles différences. Ces résultats nous permettent de dire qu'il n'y a pas apparition d'un marquage propre aux opérations de filetage dans l'usine et que le marquage initial de la ferme n'est pas masqué par un marquage usine. Ceci est certainement dû aux bonnes pratiques industrielles de cette usine d'un point de vue sanitaire.

III.3. Etudes sur la diversité des souches *Pseudomonas* au Vietnam

Dans l'étude précédente sur la communauté bactérienne présente sur les filets de *Pangasius* et à la surface des équipements de transformation dans l'usine vietnamienne, nous avons noté que les souches de *Pseudomonas* étaient résistantes aux traitements et pouvaient persister sur les produits finis et à la surface des matériaux. Ces résultats nous ont laissé penser que la caractérisation des seules populations de *Pseudomonas* pourrait être utilisée comme marquage d'origine géographique au lieu d'explorer l'ensemble des bactéries présentes sur les poissons. La validation de cette hypothèse repose sur la présence de nombreuses souches de *Pseudomonas* diverses. Cette analyse de la diversité des souches de *Pseudomonas* viables cultivables sur 25 souches isolées de l'environnement d'élevage et aussi sur des poissons *Pangasius* a été réalisée. Deux autres souches ont été isolées à partir des filets de poisson à l'usine que l'on a appelé FP 1 et FP 2. Pour l'ensemble des souches isolées, une identification classique a été réalisée. C'est un total de

27 souches de *Pseudomonas* qui ont donc été analysées par Rep-PCR en utilisant une amorce BOX-A1R. La reproductibilité des profils de Rep-PCR a été évaluée par la répétition de la PCR pour chaque souche en utilisant 2 colonies indépendantes.

Dans cette étude, nous avons utilisé l'amorce BOX-A1R qui était décrite pour la comparaison des souches de *P. aeruginosa* isolées chez les patients atteints de mucoviscidose avec une haute reproductibilité et un haut pouvoir discriminatoire (Syrmis *et al.*, 2004). De plus, Dombek *et al.* (2000) ont comparé la capacité de la REP-PCR et de la BOX-PCR pour distinguer des isolats d'*E. coli* de 7 sources différentes (humain, canard, oie, poulet, porc, mouton et vache) et ont conclu que la discrimination de la BOX-PCR est supérieure à celle de la REP-PCR. McLellan *et al.* (2003) ont montré que la REP-PCR et la ERIC-PCR produisent des résultats comparables, mais non identiques pour les groupements de dendrogramme des isolats d'*E. coli* à partir de 4 groupes (humain, chien, mouette et bétail).

Traditionnellement, les études de la diversité des *Pseudomonas* sont généralement basées sur l'isolement des souches et de leur caractérisation par des approches phénotypiques. Ces méthodes de phénotypage sont souvent utilisées pour classer les souches selon des profils biochimiques, morphologiques et aux tolérances environnementales (Cho et Tiedje, 2000 ; Tarnawski *et al.*, 2003). Cependant, la reproductibilité des méthodes basées sur le phénotype est faible (Pitt, 1988). De plus, à cause de la nature diversifiée du phénotype de *Pseudomonas*, ces méthodes ne sont pas suffisamment discriminatoires pour identifier les souches génétiquement similaires (Freitas et Barth, 2004). L'insuffisance du phénotypage a été rapportée lors de la détection précoce de l'infection chronique par *P. aeruginosa*. Elle présentait en effet un retard de 4,5 mois par rapport à la détection moléculaire (Xu *et al.*, 2004).

Dans ce contexte, les approches moléculaires offrent une alternative prometteuse pour le typage des souches *Pseudomonas*. Ces méthodes basées sur l'analyse de l'ADN génomique, peuvent être divisées en 2 groupes : le premier groupe est basé sur la technologie d'amplification de l'ADN par la PCR, incluant la méthode de Random-Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Mahenthiralingham *et al.*, 1996 ; Campbell *et al.*, 2000), la méthode de Repetitive Element-based PCR (Rep-PCR) (Syrmis *et al.*, 2004) et la méthode de MultiLocus-Sequence Typing (MLST) (Curran *et al.*, 2004 ; Vernez *et al.*, 2005). Le second groupe est basé sur la non-amplification de l'acide nucléique : la méthode de Pulsed-Field Gel

Electrophoresis (PFGE) (Grundman *et al.*, 1995 ; Romling et Tummler, 2000), la méthode de Restriction Fragment-Length Polymorphism (RFLP) (Olge *et al.*, 1987 ; Loutit et Tompkins, 1991). Les méthodes basées sur l'ADN possèdent un pouvoir discriminatoire suffisant pour distinguer les isolats génétiquement semblables, mais qui possèdent différents phénotypes (Hafiane et Ravaoarinoro, 2008).

Parmi les méthodes de génotypage, nous avons choisi la Rep-PCR pour étudier la diversité des *Pseudomonas* au Vietnam. Cette méthode est souvent utilisée pour identifier le génotype des procaryotes. Elle est analogue à la méthode RAPD dont elle diffère par les amorces qui ciblent des séquences connues de l'ADN qui sont conservées et répétitives dans le génome bactérien (Versalovic *et al.*, 1991). La Rep-PCR a été utilisée avec succès pour différencier des souches bactériennes de même genre, telles que *Frankia* (Murry *et al.*, 1995), *Legionella* (Georghiou *et al.*, 1994), *Xanthomonas* et *Pseudomonas* (Lows *et al.*, 1994). En outre, des études sur la Rep-PCR ont montré un pouvoir discriminatoire supérieur à celui d'autres méthodes de typage, comme la RAPD-PCR et le ribotypage (Olive et Bean, 1999). Ainsi, les résultats du typage par cette méthode s'avèrent en corrélation avec ceux de la PFGE, mais avec un pouvoir discriminatoire légèrement plus faible (Wu et Della-Latta, 2002). La Rep-PCR est peu coûteuse et rapide. Cependant, l'inconvénient principal de cette méthode est que tout le polymorphisme génétique est limité à un lieu spécifique du génome bactérien, ce qui peut diminuer le pouvoir discriminatoire.

On peut constater sur la Figure III.30 que les profils générés par les 27 souches de *Pseudomonas* sont très clairs et peuvent permettre de discriminer les souches entre elles. La différence dans l'intensité des bandes peut être due à la différence de la quantité d'ADN des cellules ajoutées au mélange de PCR. Le profil d'une même souche répété 2 fois sur le gel est très similaire. Cela peut donner une idée sur la bonne reproductibilité de la Rep-PCR. Le nombre des bandes par profils varient de 10 à 20 et la taille des amplicons varie de 250 bp jusqu'à 6000 bp.

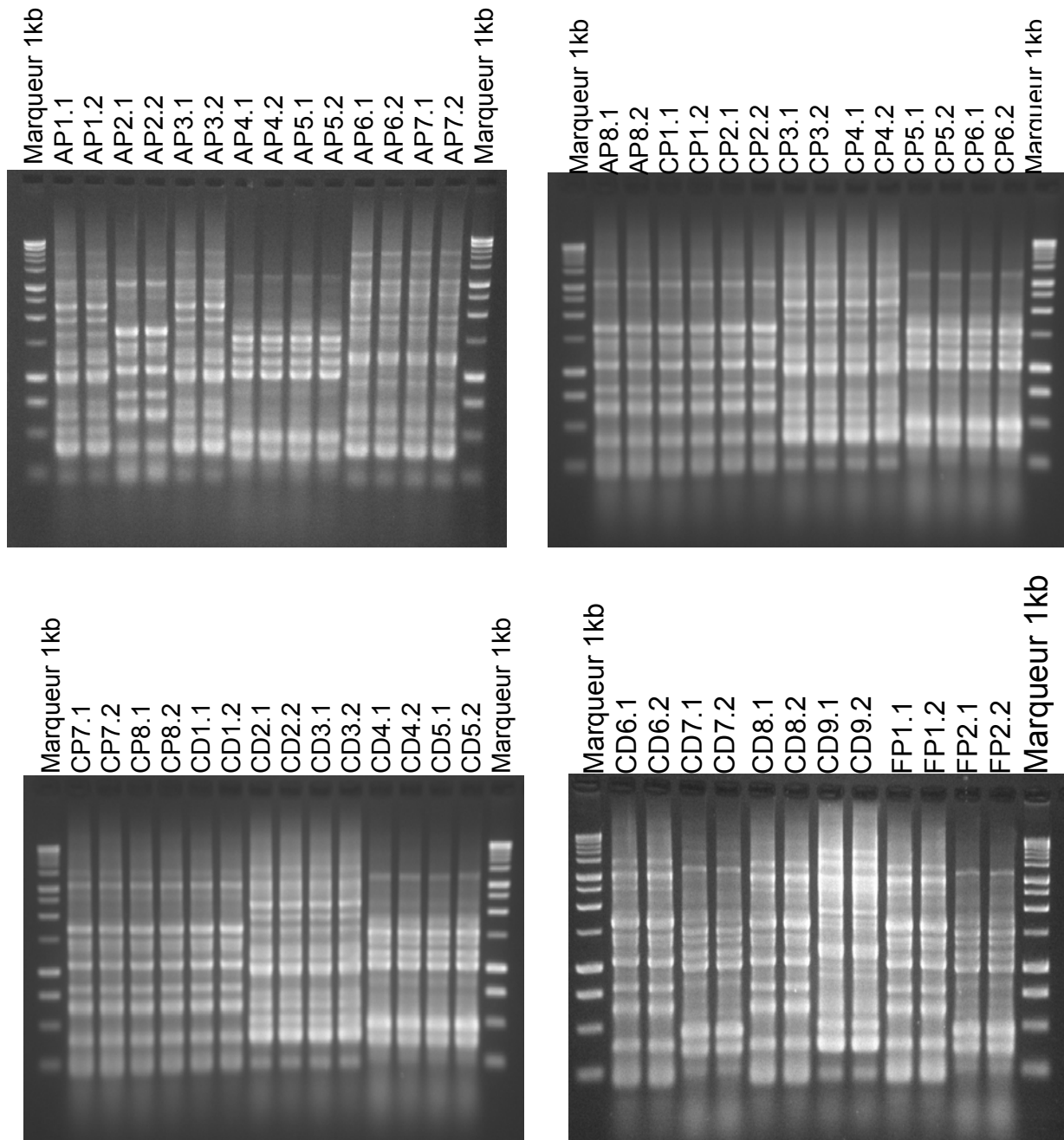


Figure III.30. : Photos de gels d'agarose des produits de Rep-PCR des souches de *Pseudomonas* isolées de l'environnement d'élevage, des poissons *Pangasius* de 3 districts différents de la région d'An Giang au Vietnam.

AP : district d'An Phu ; CP : district de Chau Phu ; CD : district de Chau Doc.

FP : filet de *Pangasius* à l'usine.

2 répétitions de Rep-PCR pour chaque souche.

Tous les profils de Rep-PCR obtenus ont été numérisés et analysés par le logiciel GelCompar (version 4.0, Applied Maths, Kortrijk, Belgium). La comparaison de tous les profils est représentée sous forme de dendrogrammes dans lesquels il est possible d'observer la plus ou moins grande similarité entre deux profils. On observe ainsi, que des profils obtenus avec la même souche mais lors d'amplifications indépendantes sont très souvent similaires à 100% et quand ce n'est pas le cas la dissimilarité est voisine de 5% mais peut aller jusqu'à 25%.

Sur le gel, les marqueurs de taille des amplicons, en principe identiques, présentent une similarité de 55% qui peut indiquer la limite de l'analyse réalisée. A 55% de similarité, il est possible de classer les profils des 27 souches en 7 grands groupes (Figure III.31). Dans chaque groupe, nous avons choisi 2 ou 3 souches selon leur niveau de similarité pour les séquencer en faisant l'hypothèse que les autres souches du même groupe étaient identiques, pour éviter le séquençage coûteux du gène de l'ARNr 16s de 27 souches. Les 16 souches choisies pour le séquençage du gène de l'ARNr 16s sont entourées sur la Figure III.31.

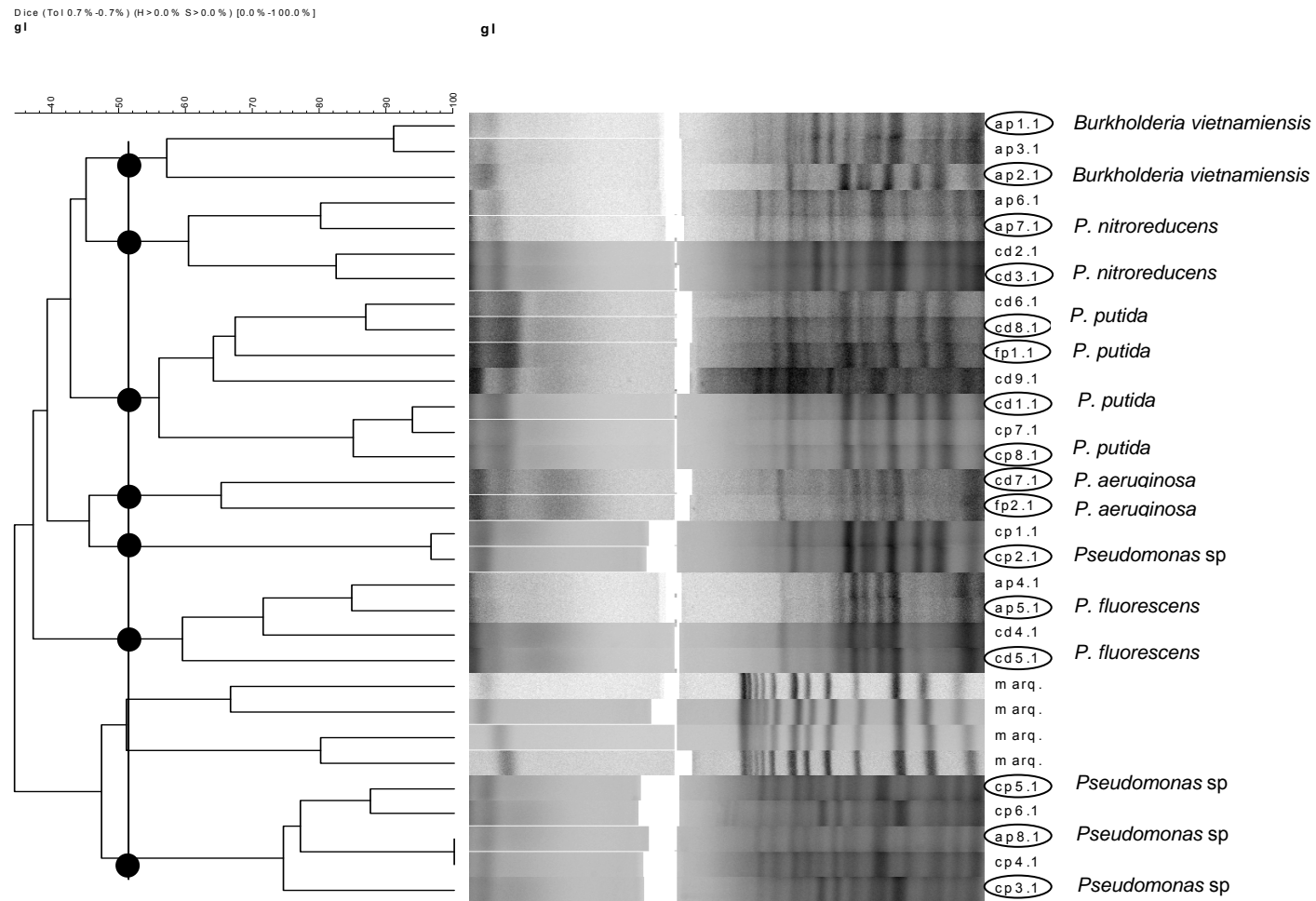


Figure III.31. : Dendrogramme des profils Rep-PCR générés par l'amorce BOX des *Pseudomonas* isolés de l'environnement d'élevage et des poissons *Pangasius* de 3 districts différents de la province d'An Giang au Vietnam
AP : district d'An Phu ; CP : district de Chau Phu ; CD : district de Chau Doc, FP : filet de poissons *Pangasius* à l'usine ; marq : marqueur de taille 1 kb

Tableau III.6. : Identité des 16 souches présumées être des *Pseudomonas* isolées de fermes, de poisson entier ou de filet de *Pangasius* au Vietnam.

Souche	Identité des souches selon GenBank	Similarité* (%)	No d'accession
AP1	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	99%	U96929
AP2	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	99%	U96928
AP7	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	100%	AJ550469
CD3	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	97%	EU878240
CD8	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	DQ481475
FP1	<i>Pseudomonas putida</i>	100%	EU697431
CD1	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	EF615008
CP8	<i>Pseudomonas putida</i>	98%	EF615007
CD7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98%	EF530572
FP2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99%	AJ565925
CP2	<i>Pseudomonas</i> sp	95%	EU590648
AP5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	97%	EF178447
CD5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	97%	EU352763
CP5	<i>Pseudomonas</i> sp	97%	AY936495
AP8	<i>Pseudomonas</i> sp	98%	AJ973277
CP3	<i>Pseudomonas</i> sp	99%	EU741649

* : % de similarité avec la souche de référence (N° d'accession cité)

Le séquençage partiel de l'ADNr 16S a été utilisé pour identifier les *Pseudomonas* isolés de l'environnement d'élevage et des *Pangasius* du delta du Mékong au Vietnam. Nous avons utilisé les couples d'amorces MM3-P13 pour amplifier un fragment d'environ 1000 bp recouvrant environ 70% de la séquence du gène codant pour l'ADNr 16S (Ferroni *et al.*, 2003).

Le séquençage a permis l'identification des *Pseudomonas* du delta du Mékong au Vietnam. La plupart des bactéries ont été identifiées jusqu'au stade de l'espèce, pour d'autres, seule l'appartenance au genre est vérifiée. Il reste cependant encore des espèces qui ne sont pas identifiées par un nom précis. Ce sont peut être de nouvelles souches appartenant au genre *Pseudomonas* avec des séquences non répertoriées dans Genbank. Il est possible aussi que le fragment d'ADN amplifié n'ait pas une taille suffisante pour une identification fine de ces souches.

Certaines espèces de *Pseudomonas* obtenues par séquençage sont celles que nous avons identifiées à partir des gels de DGGE, mais le séquençage donne plus de précision. Nous avons identifié les espèces associées aux filets de *Pangasius* qui sont *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas putida*.

Les *Pseudomonas* sont des bactéries ubiquitaires que l'on rencontre dans les sols, les aliments, les eaux douces et marines. Ils comprennent un grand nombre de « vraies » espèces *Pseudomonas* aussi bien que quelques espèces autrefois classifiées dans ce genre (Tripathy *et al.*, 2007).

Le genre *Burkholderia* a fait partie du groupe *Pseudomonas* jusqu'à ce qu'en 1992, Yabuchi *et al.* (1992), en se basant sur les homologues ADN-ADN, sur la composition des lipides et des acides gras, ont transféré 7 espèces du groupe *Pseudomonas* dans un nouveau genre, le genre *Burkholderia*. Il n'est pas étonnant d'avoir identifié ces souches comme appartenant au genre *Pseudomonas* par les méthodes classiques. Il est intéressant de retrouver ici la souche de *Burkholderia vietnamiensis* qui est une protéobactérie fixatrice d'azote de la rhizosphère du riz isolée des sols sulfatés acides au Vietnam (Tran Van *et al.*, 1996).

P. putida est une bactérie pathogène opportuniste responsable de diarrhée, d'infection de l'appareil urinaire et d'infection nosocomiale (Ladhani et Bhutta, 1998 ; Lombardi *et al.*, 2002). Bien que *P. putida* ait été associé aux infections cliniques, elle n'est pas une bactérie pathogène commune en aquaculture. Elle a été isolée chez le ayu (sweetfish) (*Plecoglossus altivelis*) par Wakabayashi *et al.* (1996) et chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) par Altinok *et al.* (2006). *P. putida* est une bactérie à croissance rapide qui peut être trouvée dans le sol ou l'eau où l'oxygène est bien présent (Lemanceau, 1992). *P. putida* est intrinsèquement résistante à une large gamme d'antibiotiques communs, tels que le chloramphénicol, l'ampicilline, l'érythromycine, la tétracycline et la streptomycine (Altinok *et al.*, 2006). Ceci explique que l'on puisse trouver un grand nombre de *P. putida* dans des fermes d'élevage au Vietnam, où l'utilisation des antibiotiques est abusive (Sarter *et al.*, 2007).

P. fluorescens est également une espèce aérobie omniprésente qui est principalement trouvée dans l'environnement comme dans le sol ou l'eau douce. En aquaculture, certaines souches de *P. fluorescens* peuvent être considérées comme pathogènes lors d'infection de la peau, des ouïes et des intestins des poissons (Dalsgaard et Madsen, 2000). D'autre part, *P. fluorescens* est employé en tant qu'agent de bio-contrôle pour protéger des plantes contre des maladies bactériennes ou fongiques (Khalequzzaman *et al.*, 2002 ; Abo-Elyousr et El-Hendawy, 2008). Dans l'eau polluée, *P. fluorescens* peut dégrader des résidus chimiques tels que les pesticides ou les métaux lourds (Wasi *et al.*, 2007).

Pseudomonas aeruginosa est considéré comme une espèce type des *Pseudomonas*. *P. aeruginosa* est une bactérie aquaphile. On l'isole des eaux de toutes provenances : eaux de rivières, d'égouts, de mer, eau potable,... En santé publique, *P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste, il est peu virulent pour les sujets en bonne santé mais très pathogène pour les sujets immunodéprimés. Il peut être impliqué dans des infections communautaires et c'est l'une des bactéries les plus fréquemment isolée lors d'infections nosocomiales (Cross *et al.*, 1983). En aquaculture, *P. aeruginosa* est souvent associé au poisson (Cahill, 1990) et a été isolé de la peau, des ouïes et de l'intestin (Trust et Sparrow, 1974). *P. aeruginosa* présente une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques et développent au cours du temps une résistance acquise (Kim et Wei, 2006).

La figure III.32. est le dendrogramme de la comparaison des séquences des 16 souches séquencées.

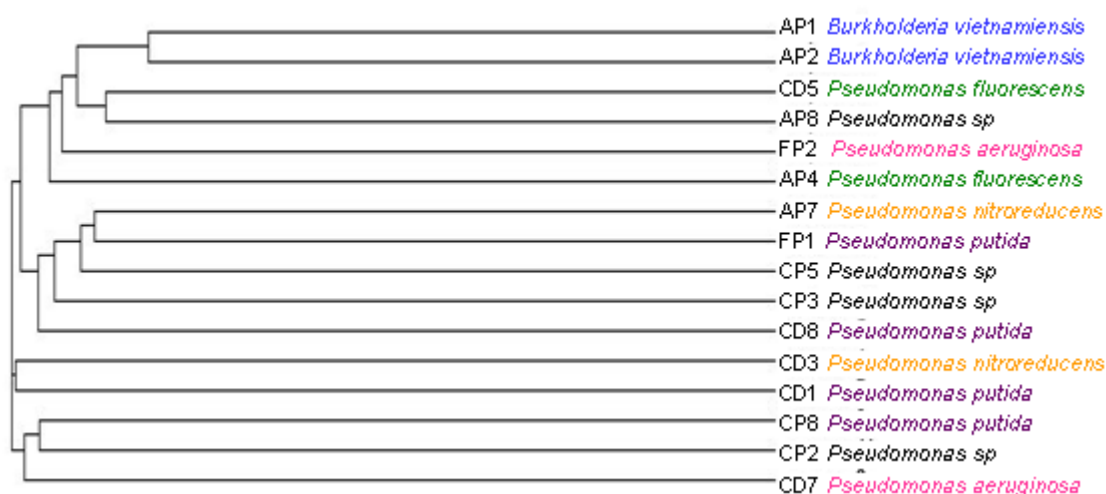


Figure III.32. : Dendrogramme de comparaison des séquences du gène de l'ARNr 16s de 16 souches présumées être des *Pseudomonas* isolés de *Pangasius* d'élevage ou de leur environnement au Vietnam.

Il est important de constater que les 16 souches diffèrent par leurs séquences amplifiées montrant en cela une diversité des souches importante et donc la potentialité de les utiliser pour marquer l'origine des poissons.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ce travail de thèse s'inscrivait dans une démarche de validation de la technique optimisée de PCR-DGGE pour tenter de relier les profils bactériens aux origines géographiques des poissons. Nous avons ensuite étudié la pérennité de ces marqueurs bactériens au cours de la saison ainsi qu'au cours des traitements de transformation au niveau pilote semi industriel et au niveau usine.

Pour atteindre cet objectif, nous avons travaillé avec des poissons d'espèces différentes qui venaient de sites différents dans des pays différents : le bar d'aquaculture de Montpellier, de Sète, de Gravelines et de Beauvois sur Mer (France) ; les poissons-chats *Pangasius* venant de 5 districts de la région d'An Giang au Vietnam et les poissons-chats *Pangasius* venant de la région de Phnom Penh et de Siem Reap au Cambodge.

La première étape de ce travail a été d'explorer la variabilité de la méthode sur des répétitions d'extraction d'ADN, d'amplification et de DGGE. Nous avons montré que deux bandes qui diffèrent par leur distance relative de migration de 0,9% peuvent être considérées comme à même distance au risque de 5%.

L'analyse des flores bactériennes de ces poissons par PCR-DGGE a montré que les profils électrophorétiques obtenus permettaient de différencier des poissons de lieux d'élevage différents. Les profils obtenus avec des poissons élevés dans un même aquarium ou un même étang ont toujours été très proches voire même identiques. Dans le cas particulier des poissons-chats du Vietnam, malgré que l'on ait pu constater une dissimilarité des profils dans des étangs différents de la même région, on obtient globalement quand on les compare avec des poissons provenant d'autres régions, que les poissons d'une même région se regroupent statistiquement. Les poissons asiatiques sont ainsi bien différenciés des poissons européens. La méthode s'est avérée extrêmement précise puisque pour une même espèce de poisson (le bar) élevé dans 2 aquariums similaires avec la même eau mais avec un circuit d'eau différent, l'environnement est suffisamment différent pour que les profils DGGE diffèrent significativement. Nous avons ainsi montré que les poissons pêchés en mer ont un profil bactérien variable alors que la même espèce élevée en aquarium obtient un profil similaire pour tous les poissons, ce qui donne le potentiel de cette technique pour différencier des poissons d'aquaculture et des poissons pêchés en mer.

Nous avons aussi prouvé que les profils DGGE de l'ADN bactérien extrait des poissons ou de l'eau dans un même étang sont étroitement similaires. Ceci confirme notre hypothèse de départ concernant le fait que l'environnement influence directement la diversité des flores bactériennes des poissons. Ces résultats concordent avec d'autres études qui ont prouvé la relation directe qui existe entre les flores aquatiques et les bactéries commensales des poissons (De Sousa et Silva-Sousa, 2001 ; Al-Harbi et Uddin, 2003).

Le séquençage des bandes extraites des gels de DGGE nous a permis d'identifier les souches bactériennes dominantes des poissons-chats. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux d'autres auteurs qui ont montré la prédominance des bactéries à Gram négatif chez les poissons-chats *Pangasius* du Vietnam (Ratanaporn, 2005 ; Huy *et al.*, 2007). Les bactéries des poissons-chats appartiennent aux genres *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Lactococcus*, *Staphylococcus* et *Enterococcus*. Au total, 15 souches ont été identifiées par séquençage sur des poissons-chats *Pangasius*.

La pérennité des marqueurs bactériens au cours de la saison a été confirmée, même si une légère différence a été observée entre la saison des pluies et la saison sèche. La discrimination est restée possible malgré le changement de saison. Les poissons capturés dans le même site présentant des profils plus proches entre eux quelle que soit la saison qu'entre les profils de deux poissons de deux sites différents.

Les traitements de transformation tels que le séchage et le marinage peuvent avoir une forte influence sur la communauté bactérienne des poissons. La différence observée entre les profils bactériens avant et après ces deux traitements a montré leurs effets destructifs, en relation avec leur effet connu sur la destruction des flores microbiennes ainsi que sur celle de la molécule d'ADN.

Les techniques de stabilisation par le froid telles que la congélation ou la réfrigération ne modifient pas fortement les profils DGGE des extraits d'ADN bactériens des poissons. Après 3 semaines de stockage à -20°C, on retrouve en effet le même profil DGGE entre les filets de poissons frais et les filets congelés. Cependant, après 2 semaines de stockage à 4°C, une légère différence entre les profils DGGE a été observée entre les filets de poissons frais et ceux des poissons réfrigérés permettant d'émettre l'hypothèse que certaines bactéries psychrophiles peuvent se développer

pendant la réfrigération. Nous avons également étudié la stabilité des profils DGGE de poissons lors de congélations et décongélations successives, événements qui peuvent survenir lors de la rupture de la chaîne du froid pendant le stockage et le transport. Après 10 cycles de congélation-décongélation, les mêmes profils DGGE ont été observés. Ces résultats confirment la possibilité d'utiliser les marqueurs bactériens comme marqueurs d'origine géographique pour les poissons importés entiers ou en filets à l'état congelé. Nous avons vérifié ces résultats sur la persistance des marqueurs bactériens au cours des traitements technologiques au niveau industriel dans une usine de transformation en filets des poissons-chats *Pangasius* qui est la principale forme d'exportation de poissons élevés au Vietnam.

Des analyses de PCR-DGGE sur les filets de poissons tout au long du processus industriel de production de filets congelés a permis de montrer que le profil DGGE des poissons entre le produit initial et le produit fini était différent mais conservait suffisamment d'informations pour discriminer l'origine.

Au cours de cette étude, nous avons pu montrer que l'environnement industriel n'était la source d'aucun nouveau marquage d'origine propre au site industriel. Les profils DGGE obtenus à partir des filets de poissons et ceux des prélèvements de l'environnement montrent la présence de flores microbiennes très proches avec une diversité des souches qui s'appauvrit tout au long du processus de fabrication. Par contre aucune bande nouvelle propre à l'environnement n'apparaît, signe, soit de bonnes pratiques de fabrication respectant les règles d'hygiène dans cette usine vietnamienne, soit que le niveau de populations des éventuelles contaminations de l'environnement ne permet pas une bonne extraction et une bonne amplification lors de la PCR-DGGE.

Le séquençage a permis d'identifier de nombreuses souches de *Pseudomonas* dont la présence est pérenne tout au long du processus de production et de transformation. Cela nous a donné l'idée d'étudier la diversité des *Pseudomonas* du delta du Mékong, lieu d'élevage le plus important des poissons-chats *Pangasius* pour savoir si la caractérisation des souches bactériennes appartenant au genre *Pseudomonas* pourrait servir de marqueur d'origine au lieu d'explorer l'ensemble des flores bactériennes présentes sur les poissons. Au total, 27 souches présumées de *Pseudomonas* ont été isolées à partir des poissons-chats et aussi de l'environnement d'élevage de ces poissons. Après analyse statistique des profils générés par Rep-PCR, les souches ont pu être classées en 7 grands groupes.

16 souches ont été identifiées après séquençage jusqu'au stade de l'espèce, il s'agit de *P. putia*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. nitroreducens* et *Burkholderia vietnamiensis*, anciennement classée comme *Pseudomonas* (Yabuchi *et al.*, 1992). Ceci étant, ces 16 souches présentent des séquences du gène de l'ARNr 16S suffisamment différentes pour laisser penser que le genre *Pseudomonas* pourrait à lui seul permettre la détermination d'origine à condition de disposer d'amorces de PCR propres à amplifier spécifiquement les souches appartenant à ce genre ou tout autre méthode moléculaire capable de caractériser finement les souches isolées. Si globalement, la méthode développée ici permet de différencier des poissons d'origines différentes, son utilisation pour déterminer l'origine d'un poisson nécessite la création d'une banque de données riche des profils de PCR-DGGE de nombreux poissons d'origine certifiée mais aussi d'un logiciel permettant la comparaison statistique de ces profils. Cela suppose des contraintes importantes. Il faudrait que cette banque de données soit souvent mise à jour et contienne des informations concernant les facteurs qui peuvent influencer les marqueurs : espèce de poissons, pratique d'élevage, incidence de l'utilisation d'antibiotiques...

A l'issue d'un tel travail de thèse, il reste toujours des insatisfactions et plusieurs points auraient mérité être soumis à investigation, ce qui nous permet de présenter quelques perspectives pour la suite des études à mener :

- ✓ l'observation de l'effet saisonnier sur la pérennité des marqueurs sur au moins 3 années consécutives ;
- ✓ la réalisation d'études sur 2 espèces de poissons élevées dans une même ferme pour valider l'effet environnemental *versus* l'effet espèce ;
- ✓ la création d'une base des données contenant les profils DGGE de poissons élevés ou capturés dans des régions différentes. Cette banque serait associée à un logiciel de traitement d'image et d'analyses statistiques pour la comparaison des profils,
- ✓ la confirmation que les *Pseudomonas* sont de bons marqueurs d'origine puis la caractérisation fine par des techniques moléculaires.

Cette méthode est maintenant appliquée en routine en laboratoire et a déjà permis de produire d'excellents résultats sur d'autres aliments comme les fruits par exemple (Le Nguyen *et al.*, 2008b). L'idée initiale (environnement-écologie-origine) a

servit de base à l'obtention d'un projet européen dont un des Work Packages consiste à comparer les origines géographiques du karité par cette méthode mais en considérant les flores microbiennes globalement, en associant levures et moisissures. C'est dans le cadre de ce projet européen que nous avons commencé la thèse de notre collègue égyptien M. Aly El Sheikha.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abee, T., & Wouters, J. A. (1999). Microbial stress response in minimal processing. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 65-91.
- Abo-Elyousr, K. A. M., El-Hendawy, H. H. (2008). Integration of *Pseudomonas fluorescens* and acibenzolar-S-methyl to control bacterial spot disease of tomato. *Crop Protection*, 27, 1118-1124.
- ACTA-ACTIA (1998). Traçabilité. Guide pratique pour l'agriculture et l'industrie alimentaire, Paris, 80 p.
- Akinbowale, O., Peng, H., Grant, P., & Barton, M. D. (2007). Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30, 177-182.
- Allen, D. A., Austin, B., & Colwell, R. R. (1983). Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with a freshwater fishery. *Journal of General Microbiology*, 129, 2043-2062.
- Alippi, A. M., López, A. C., & Aguilar, A. M. (2002). Differentiation of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American foulbrood of honeybees, by using PCR and Restriction Fragment Analysis of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3655-3660.
- Altinok, I., Kayis, S., & Capkin, E. (2006). *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout. *Aquaculture*, 261, 850-855.
- Ahman, B., Wright, S. M., & Howard, B. J. (2001). Effect of origin of radiocaesium on the transfer from fallout to reindeer meat. *Science of the Total Environment*, 278, 171-181.
- Al-Harbi, A. H., & Uddin, M. N. (2003). Quantitative and qualitative studies on bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis x O. aureus*) cultured in earthen pond in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 34, 43-48.
- Al Harbi, A. H., & Uddin, M. N. (2004). Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus x Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 229, 37-44.
- Al-Harbi, A., & Uddin, N. (2005). Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 205, 566-572.

- Allen, D. A., Austin, B., & Colwell, R. R. (1983). *Aeromonas media*, a new species isolated from river water. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33, 599-604.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. F. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59, 143-169.
- Ampe, F., Ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C., & Guyot, J. P (1999). Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 5464-5473.
- Anderson, R. L., Holland, B. W., Carr, J. K., Bond, W. W., & Farvero, M. S. (1990). Effect of disinfectants on pseudomonads colonized on the interior surface of PVC pipes. *American Journal of Public Health*, 80, 17-21.
- Andersson, I., Lönsjö, H., & Rosén, K. (2001). Long-term studies on transfer of ¹³⁷Cs from soil to vegetation and to grazing lambs in a mountain area in Northern Sweden. *Journal of Environmental Radioactivity*, 52, 45-66.
- Andrew, W. H., Wilson, C. R., Poelma, P. L., & Romero, A. (1977). Bacterial survey of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) at the retail level. *Journal of Food Science*, 42, 359-363.
- Anonyme n°1 (2004). Evaluation du retraçage et de la traçabilité du poisson et des produits de la mer de l'Atlantique.
<http://www.acoa.ca/f/library/reports/atlanticfish/atlanticfish.pdf>
- Anonyme n°2 (2002). Tracefish project.
<http://www.onefish.org/servlet/CDSServlet?status=ND0xNTQwNy5wcmoxOTEyNCY2PWVuJmZPXByb2pIY3RzJmM3PWluZm8~>
- Anonyme n°3 (2004). Fishnose project.
<http://62.161.75.193:8484/fishnose/public/index.php>
- Antoine, F. R., Wei, C. I., Otwell, W. S., Sims, C. A., Littell, R. C., Hogle, A. D. & Marshall, M. R. (2002). Analysis of biogenic amines and their precursor free amino acids in mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*). *Journal of Food Chemistry*, 26, 131-152.
- Apun, K., Yusof, A. M., & Jugang, K. (1999). Distribution of bacteria in tropical freshwater fish and ponds. [*International Journal of Environmental Health Research*, 9, 285-292.](#)

- Aritua, V., Nanyonjo, A., Kumakech, F., & Tushemereirwe, W. (2007). Rep-PCR reveals a high genetic homogeneity among Ugandan isolates of *Xanthomonas campestris* pv *musacearum*. *African Journal of Biotechnology*, 6, 179-183.
- Ariyama, K., Horita, H., & Yasui, A. (2004). Application of inorganic element ratios to chemometrics for determination of the geographic origin of Welsh onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5803-5809.
- Arrignon, J. (1993). Pisciculture en eau douce: le Tilapia. Maisonneuve et Larose, Paris, 125 p.
- Austin, B., & Al-Zahrani, A. M. J. (1988). The effect of antimicrobial compounds on the gastrointestinal microflora of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 33, 1-14.
- Avrahami, S., Liesack, W., & Conrad, R. (2003). Effect of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. *Environmental Microbiology*, 5, 691-705.

B

- Bano, N., & Hollibaugh, J. T. (2002). Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 505-518.
- Barbaste, M., Robinson, K., Guilfoyle, S., Medina, B., & Lobinski, R. (2002). Precise determination of the strontium isotope ratios in wine by inductively coupled plasma sector field multicollector mass spectrometry (ICP-SF-MC-MS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17, 135-137.
- Bagge-Rawn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J. N., Johansen, C., & Gram, L. (2003). The microbial ecology of processing equipment in different fish industries-analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 239-250.
- Barnabé, G. (1989). L'Elevage du loup et de la daurade. In Barnabé, G. (Eds). *Aquaculture volume 2*. Technique et Documentation-Lavoisier, pp 675-720.
- Basti, A. A., Misaghi, A., Salehi, T. Z., & Kamkar, A. (2006). Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. *Food control*, 17, 183-188.
- Bej, A. K., Mahbubani, M. H., & Atlas, R. M. (1991). Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 597-600.

- Ben-Gigirey, B., Vieites-Baptista de Sousa, J. M., Villa, T.G., & Barros-Velázquez, J. (1999a). Chemical changes and visual appearance of albacore tuna as related to frozen storage. *Journal of Food Science*, 64, 20-24.
- Ben-Gigirey, B., Vieites-Baptista de Sousa, J. M., Villa, T.G., & Barros-Velázquez, J. (1999b). Histamine and cadaverine production by bacteria isolated from fresh and frozen albacore (*Thunnus alalunga*). *Journal of Food Protection*, 62, 933-939.
- Ben-Gigirey, B., Vieites-Baptista de Sousa, J.M., Villa, T.G., & Barros-Velázquez, J. (2000). Characterization of biogenic amine-producing *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from white muscle of fresh and frozen albacore tuna. *International journal of food microbiology*, 57, 19-31.
- Ben-Gigirey, B., Vieites, J.M., Kim, S.H., An, H., Villa, T.G., & Barros-Velázquez, J. (2002). Specific detection of *Stenotrophomonas maltophilia* strains in albacore tuna (*Thunnus alalunga*) by reverse dot-blot hybridization. *Food Control*, 13, 293-299.
- Ben Omar, N., & Ampe, F. (2000). Microbial community dynamics during production of Mexican fermented maize product pozol. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3664-3673.
- Berge, G. M. (1990). Freeze branding of Atlantic halibut. *Aquaculture*, 89, 383-386.
- Bernagozzi, M., Bianucci, F., & Sacchetti, R. (1995). Prevalence of *Aeromonas* spp. in surface waters. *Water Environment Research*, 67, 1060-1064.
- Berry, E.D., & Foegeding, P.M. (1997). Cold temperature adaptation and growth of microorganisms. *Journal of Food Protection*, 60, 1583-1594.
- Bessems, E. (1998). The effect of practical conditions on the efficacy of disinfectants. *International biodeterioration & biodegradation*, 41, 177-183.
- Biering, G., Karlsson, S., Clark, N., Jonsdottir, K. E., Ludvigsson, P., & Steingrimsen, O. (1989). Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. *Journal of Clinical Microbiology*, 27, 2054-2056.
- Blackman, I. C., & Frank, J. F. (1996). Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. *Journal of Food Protection*, 59, 827-831.
- Bohuon, P., Collignan, A., Rios, G. M., & Raoult-Wack, A. L. (1998). Soaking process in ternary liquids: Experimental study of the mass transport under natural and forced convection. *Journal of Food Engineering*, 37, 451-469.

- Bollman, J., Ismond, A., Blank, G. (2001). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in frozen food: impact of the cold shock response. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 127-138.
- Borner, M., & Förstel, H. (2003). Stable isotope variation as a tool to trace the authenticity of beef. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 301-310.
- Boulange-Petermann, L., Baroux, B., Bellon-Fontaine, M. N. (1993). The influence of metallic surface wettability on bacterial adhesion. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 7, 221-230.
- Boulange-Petermann, L., Bellon-Fontaine, M. N., & Baroux, B. (1995). Adhésion de *Leuconostoc mesenteroides* à des surfaces d'acier inoxydables polarisées. In : Bellon-Fontaine, M. N., & Fourniat, J. (Eds). *Adhésion des micro-organismes aux surfaces*. Technique et Documentation, Paris, pp 31-44.
- Bowyer, J., Verrills, N., Gillings, M. R., & Holmes, A. J. (2000). Heteroduplex mobility assay as a tool for predicting phylogenetic affiliation of environmental ribosomal RNA clones. *Journal of Microbiological Methods*, 41, 155-160.
- Breas, O., Reniero, F., & Serrini, G. (1994). Isotope ratio mass-spectrometry analysis of wines from different European countries. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 8, 967-970.
- Brescia, M.A., Di Martino, G., Guillou, C., Reniero, F., Sacco, A., & Serra, F. (2002). Differentiation of the geographical origin of durum wheat semolina samples on the basis of isotopic composition. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16, 2286-2290.
- Brock, T. D. (1987). The study of microorganism in situ: progress and problem. *Symposium of Society for General Microbiology*, 41, 1-17.
- Brunk, C.F., & Eis, N. (1998). Quantitative measure of small-subunit rRNA gene sequences of the kingdom *Korarchaeota*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 5064-5066.
- Buchanan, R. L., & Palumbo, S. A. (1985). *Aeromonas hydrophilia* and *Aeromonas sobria* as potencial food poisoning species: a review. *Journal of Food Safety*, 7, 15-29.
- Burton, J. P., Cadieux, P. A., & Reid, G. (2003). Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 97-101.

Byun, J. W., Park, S. C., Ben, Y., & Oh, T. K. (1997). Probiotic effect of *Lactobacillus* sp. DS-12 in flounder (*Paralichthys olivaceus*). *The Journal of General and Applied Microbiology*, 43, 305-308.

C

Cacot, P. (1993). Présentation de la pisciculture en cages flottantes dans le Sud-Viet Nam. Caractéristiques de l'élevage sur le Mékong de *Pangasius pangasius*. *Mémoire de DAA à l'INAPG, Département des Productions Animales*. CIRAD-EMVT/GAMET , 107 p.

Cacot, P., Legendre, M., Dan, T. Q., Tung, L. T., Liem, P. T., Mariojouis, C., & Lazard, J. (2002). Induced ovulation of *Pangasius bocourti* (Sauvage, 1880) with a progressive hCG treatment. *Aquaculture*, 213, 199-206.

Cacot, P., Eeckhoutte, P., Muon, D. T., Trieu, N. V., Legendre, M., Mariojouis, C., & Lazard, J. (2003). Spermiation hCG induced and management of milt in *Pangasius bocourti* (S). *Aquaculture*, 215, 67-77.

Cacot, P., & Lazard, J. (2004). Domestication d'espèces de poissons-chats du Mékong de la famille des Pangasiidae. *INRA Productions Animales*, 17, 195-198.

Cahill, M. M. (1990). Bacterial flora of fishes: a review. *Microbial Ecology*, 19, 21-41.

Cai, Y., Benno, Y., Nakase, T., & Oh, T. K. (1998). Specific probiotic characterization of *Weissella hellenica* DS – 12 isolated from flounder intestine. *Journal of General and Applied Microbiology*, 44, 311-316.

Cai, Y., Suyanandana, P., Saman, P., & Benno, Y. (1999). Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. *Journal of General and Applied Microbiology*, 45, 177-184.

Callon, C., Millet, L., & Montel, M. C. (2004). Diversity of lactic bacteria isolated from AOC Salers cheese. *Journal of dairy research*, 71, 231-244.

Camin, F., Wietzerbrin, K., Cortes, A. B., Haberhauer, G., Lees, M., & Versini, G. (2004). Application of multielement stable isotope ratio analysis to the characterization of French, Italian and Spanish cheeses. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 52, 6592-6601. Campbell, A. C., & Buswell, J. A. (1983). The intestinal microflora of farmed Dover sole (*Solea solea*) at different stages of fish development. *Journal of Applied Bacteriology*, 55, 215-223.

Campbell, M., Mahenthiralingam, E., & Speert, D. P. (2000). Evaluation of random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 4614-4615.

- Cardinal, M., Viallon, C., Thonat, C., & Berdagué, J-L. (2000). Pyrolysis-mass spectrometry for rapid classification of oyster according to rearing area. *Analysis*, 28, 825-829.
- Carneiro, L. A. M., Silva, A. P. S., Merquior, V. L. C., & Queiroz, M. L. P. (2003). Antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli isolated from infant formulas. *FEMS Microbiology Letters*, 228, 175-179.
- Carson, J., Gudkovs, N., Austin, B. (1993). Characteristics of an Enterococcus-like bacterium from Australia and South Africa, pathogenic of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 16, 381-388.
- Casalta, E., Cachenaute, J. M., Aubert, C., Dufrene, F., Noël, Y., & Beuvier, E. (2004). Application of specific starters for the manufacture of Venaco cheese. *Lait*, 85, 205-222.
- Cerioti, G., Caroli, A., Rizzi, R., & Crimella, C. (2003). Genetic relationships among taurine (*Bos taurus*) and zebu (*Bos indicus*) populations as revealed by blood groups and blood proteins. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120, 57-67.
- Chan, K. F., Tran, H. L., Kanenaka, R. Y., & Kathariou, S. (2001). Survival of clinical and poultry-derived isolates of *Campylobacter jejuni* at a low temperature (4°C). *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4186-4191.
- Chauret, C., Volk, C., Creason, R., Jarosh, J., Robinson, J., & Warners, C. (2001). Detection of *Aeromonas hydrophila* in a drinking-water distribution system: a field and pilot study. *Canadian Journal of Microbiology*, 47, 782-786.
- Chen, S. C., Lin, Y. D., Liaw, L. L., & Wang, P. C. (2001). *Lactococcus garvieae* infection in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. *Diseases of Aquatic Organisms*, 45, 45-52.
- Cheng, W., Liu, C. H., Chen, J. C. (2002). Effect of nitrite on interaction between the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its pathogen *Lactococcus garvieae*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 50, 189-197.
- Chikthimmah, N., Anantheswaran, R. C., Roberts, R. F., Mills, E. W., & Knabel, S. J. (2001). Influence of sodium chloride on growth of lactic acid bacteria and subsequent destruction of *Escherichia coli* O157:H7 during processing of Lebanon bologna. *Journal of Food Protection*, 64, 1145-1150.

- Chintalapati, S., Kiran, M. D., & Shivaji, S. (2004). Role of membrane fatty acids in cold adaptation. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 50, 631-642.
- China, B., Clinquart, A., & Daube, G. (2004). Développement d'un système de traçabilité génétique chez le porc basé sur le séquençage de régions riches en SNP. *Journées Recherche Porcine*, 36, 289-292.
- Cho, J. C., & Tiedje, J. M. (2000). Biogeography and degree of endemism of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5448-5456.
- Clavero, M. R., & Beuchat, L. R. (1996). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Broth and Processed Salami as Influenced by pH, Water Activity, and Temperature and Suitability of Media for its recovery. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2735-2740.
- Coates, K. J., Beattie, J. C., Morgan, I. R., & Widders, P. R. (1995). The contribution of carcass contamination and the boning process to microbial spoilage of aerobically stored pork. *Food microbiology*, 12, 49-54.
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C., & Comi, G. (2001). Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5113-5121.
- Coetzee, P. P., & Vanhaecke, F. (2005). Classifying wine according to geographical origin via quadrupole-based ICP–mass spectrometry measurements of boron isotope ratios. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383, 977-984.
- Comité des pêches (2004). Traçabilité et étiquetage dans le commerce du poisson. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/013/j1214f.pdf>
- Comité des pêches (2006). Normes de sécurité sanitaire et de qualité applicables au commerce international du poisson. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/013/k2256f.pdf>
- Comité des pêches (2007). Rapport de la vingt-septième session du Comité des pêches. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1160f/a1160f00.pdf>
- Coppola, S., Blaiotta, G., Ercolini, D., & Moschetti, G. (2001). Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 414-420.

- Cook, D. W. (1997). Refrigeration of oyster sheelstock: conditions which minimize the outgrowth of *Vibrio vulnificus*. *Journal of Food Protection*, 60, 349-352.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., & Marrie, T. J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, 41, 435-464.
- Cotton, L. N., & Marshall, D. L. (1998). Predominant microflora on catfish processing equipment. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 18, 650-654.
- Craun, G. F. (1991). Cause of waterborne outbreaks in the US. *Water Science and Technology*, 24, 17-20.
- Cross, A., Allen, J. R., Burke, J., Duce, G., Harris, A., John, J., Johnson, D., Lew, M., MacMillan, B., Skalova, R., Wenzel, R., & Tenney, J. (1983). Noscomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: a review of recent trends. *Reviews of Infectious Diseases*, 5, (Supplement), S837-S845.
- Crump, B. C., Kling, G. W., Bahar, M., & Hobbie, J. E. (2003). Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matters source. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2253-2268.
- Curran, B., Jonas, D., Grundman, H., Pitt, T., & Dowson, C. G. (2004). Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 5644-5649.
- Curtis, L.M., Patrick, M., & Blackburn, C. D. (1995). Survival of *Campylobacter jejuni* in foods and comparison with a predictive model. *Letters in Applied Microbiology*, 21, 194-197.

D

- Dalsgaard, I., & Madsen, L. (2000). Bacterial pathogens in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), reared at Danish freshwater farms. *Journal of Fish Diseases*, 23, 199-209.
- Davies, A. R., Capell, C., Jehanno, D., Nychas, G. J. E., & Kirby, R. M. (2001). Incidence of foodborne pathogens on European fish. *Food control*, 12, 67-71.
- Daskalov, H. (2006). The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control*, 17, 474-483.
- Debord, M. (2003). Les enjeux et les objectifs de la traçabilité géographique en agriculture. *Géotraçabilité*, 3, 3-4.

- Deere, D., Porter, J., Pickup, R. W., & Edwards, C. (1996). Survival of cells and DNA of *Aeromonas salmonicida* released into aquatic microcosms. *Journal of Applied Bacteriology*, 81, 309-318.
- Demchick, P. H., Palumbo, S. A., & Smith, J. L. (1982). Influence of pH on freeze-thaw lethality in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Safety*, 4, 185-189.
- DePaola, A., & Robert, M. C. (1995). Class D and E tetracycline resistance determinants in Gram negative bacteria from catfish ponds. *Molecular and Cellular Probes*, 9, 311-313.
- DePaola, A., Peeler, J. T., & Rodrick, G. E. (1995). Effect of Oxytetracycline-Medicated feed on antibiotic resistance of Gram-negative bacteria in catfish ponds. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2335-2340.
- Deponge, C., Coulon, J. B., Bonnefoy, J. C., Ritz, P., & Renou, J. P. (2001). Caractérisation du lait en fonction de son origine géographique et du mode d'alimentation par RMN ^{13}C et SMRI. *Rencontres autour des recherches sur les ruminants*, 8, 57-60.
- De Sousa, J. A., & Silva-Sousa, A. T. (2001). Bacterial community associated with fish and water from Congohas River, Sertaneja, Parana, Brasil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 44, 373-381.
- Destro, M. T., Leitão, M. F. F., & Farber, J. M. (1996). Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 705-711.
- De Virgilio, C., Hottiger, T., Dominguez, J., Boller, T., & Wiemken, A. (1994). The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in Yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *European journal of Biochemistry*, 219, 179-186.
- Dewettinck, T., Hulsbosch, W., Van Hege, K., Top, E.M., & Verstraete, W. (2001). Molecular fingerprinting of bacterial populations in ground water and bottled mineral water. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 412-418.
- DiChristina, T. J., & DeLong, E. F. (1994). Isolation of anaerobic respiratory mutants of *Shewanella putrefaciens* and genetic analysis of mutants deficient in anaerobic growth on Fe^{3+} . *Journal of Bacteriology*, 176, 1464-1474.
- Diez, B., Pedros-Alio, C., Marsh, T. L., & Massana, R. (2001). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the Diversity of marine

- picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2942-2951.
- Diler, O., Altun, S., Adiloglu, A. K., Kubilay, A., & Isikli, B. (2002). First occurrence of Streptococcosis affecting farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 22, 21-25.
- Dombek, P.E., Johnson, L. K., Zimmerley, S. T., & Sadowsky, M. J. (2000). Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2572-2577.
- Donskey, C. J., Hujer, A. M., Das, S. M., Pultz, N. J., Bonomo, R. A., & Rice, L. B. (2003). Use of denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the stool microbiota of hospitalized patients. *Journal of Microbiological Methods*, 54, 249-256.
- Dukan, S., & Touati, D. (1996). Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: Resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *Journal of Bacteriology*, 178, 6145-6150.
- Dutta, R., Kashwon, K. R., Bhuyan, M., Hines, E. L., & Garner, J. W. (2003). Electric nose based tea quality standardization. *Neural Networks*, 16, 547-853.
- Dutton, C. M., Paynton, C., & Sommer, S. (1993). General method for amplifying regions of very high G+C content. *Nucleic Acids Research*, 21, 2953-2954.

E

- Edel, V., Steinberg, C., Avelange, I., & Alabouvette, C. (1995). Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology*, 85, 579-585.
- Edenborn, S. L., & Sexstone, A. J. (2007). DGGE fingerprinting of culturable soil bacterial communities complements culture-independent analyses. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 1570-1579.
- Eichner, C. A., Rainer, W. E., Timmis, K. N., & Wagner-Döbler, I. (1999). Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 102-109.
- El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A., & Ogier, J. C. (2007). Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian Domiati cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1248-1255.
- El-Kest, S. E., & Marth, E. H. (1992). Freezing of *Listeria monocytogenes* and other microorganisms: a review. *Journal of Food Protection*, 55, 639-648.

- Ellajosyula, K. R., Doores, S., Mills, E., Wilson, R. A., Anantheswaran, R.C., & Knabel, S. J. (1998). Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in Lebanon bologna by interaction of fermentation pH, heating temperature and time. *Journal of Food Protection*, 61, 152-157.
- Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G., & Coppola, S. (2001). The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of Natural Whey Clusters for water-buffalo Mozzarella cheese production: bias of “culture dependent” and “culture independent” approaches. *Systematic and Applied Microbiology*, 24, 610-617.
- Ercolini, D., Hill, P. J., & Dodd, C. E. R. (2003). Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3540-3548.
- Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 297-314.
- Espejo, R. T., Feijóo, G. G., Romero, J., & Vásquez, M. (1998). PAGE analysis of the heteroduplexes formed between PCR-amplified 16S rRNA genes: estimation of sequence similarity and rDNA complexity. *Microbiology*, 144, 1611-1617.
- Euzéby, J. P. (2003). Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire.
<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/aa/acinetobacter.html>
- Euzéby, J. P. (2005). Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire.
<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ss/stenotrophomonas.html>

F

- FAO (2003). Rapport sur les pêches n° 702. FAO, Rome.
<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/006/y5025f/Y5025f00.pdf>
- FAO/SOFIA (2002). La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2002. FAO, Rome.
<http://www.fao.org/docrep/005/y7300e/y7300e00.htm>
- FAO/SOFIA (2006). La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2006. FAO, Rome.
<http://www.fao.org/docrep/009/a0699f/a0699f00.htm>
- FAO Fisheries & Aquaculture *Dicentrarchus labrax*.
http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Dicentrarchus_labrax/en
- Fagan, J. D., Gormley, T. R., & Mhuirheartaigh, M. U. (2003). Effect of freeze-chilling, in comparison with fresh, chilling and freezing, on some quality parameters

- of raw whiting, mackerel and salmon portions. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 36, 647-655.
- Faille, C., Julien, C., Fontaine, F., Bellon-Fontaine, M. N., Slomianny, C., & Benezech, T. (2002). Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Canadian Journal of Microbiology*, 48, 728-738.
- Fauconneau, B., & Laroche, M. (1996). Characteristics of the flesh and quality of products of catfishes. *Aquatic Living Resources*, 9, 165-179.
- Farber, J. M., & Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food borne pathogens. *Microbiological Reviews*, 55, 476-511.
- Farell, G. M., & Upton, M. E. (1978). The effect of low temperature on the growth and survival of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* when inoculated on bacon. *International Journal of Food Science & Technology*, 13, 15-23.
- Fasoli, D., Marzotto, M., Rizzotti, L., Rossi, F., Dellaglio, F., & Torriani, S. (2003). Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 59-70.
- Fatal, B., Dotan, A., Parpari, L., Techorsh, Y., & Cabelli, V. J. (1993). Microbiological purification of fish grown in fecally contaminated commercial fishpond. *Water Science and Technology*, 27, 303-311.
- Fernandes, C. F., Flick, G. J., Silva, J. L., & McCaskey, T. A. (1997). Influence of processing schemes on indicative bacteria and quality of fresh aquacultured catfish fillets. *Journal of Food Protection*, 60, 54-58.
- Fernández-Cáceres, P. L., Martín, M. J., Pablos, F., & González, A. G. (2001). Differentiation of tea (*Camellia sinensis*) varieties and their geographical origin according to their metal content. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49, 4775-4779.
- Ferrier, D. (1996). La protection des consommateurs. Dalloz, Paris, 578 p.
- Ferroni, A., Sermet-Gaudelus, I., Abachin, E., Quesnes, G., Lenoir, G., Berche, P., & Gaillard, J. L. (2003). Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches atypiques de bacilles à Gram négatif non fermentants isolées chez des patients atteints de mucoviscidose. *Pathologie Biologie*, 51, 405-411.
- Fisher, S. G., & Lerman, L. S. (1983). DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting

theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 80, 1579-1583.

Fisheries statistics and economics, USA (2001).
<http://www.st.nmfs.noaa.gov/st1/index.html>.

Flórez, A.B., & Mayo, B. (2006). PCR-DGGE as a tool for characterizing dominant microbiol populations in the Spanish blue-veined Cabrales cheese. *International Dairy Journal*, 16, 1205-1210.

Fonnesbech Vogel, B., Huss, H. H., Ojeniyi, B., Ahrens, P., & Gram, L. (2001). Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2586-2595.

Fontaine, J., Hörr, J., & Schirmer, B. (2001). Near-Infrared Reflectance Spectroscopy enables the fast and accurate prediction of the essential amino acid contents in soy, rapeseed meal, sunflower meal, peas, fishmeal, meat meal products and poultry meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 57 -66.

Fortunato, G., Memic, K., Wunderli, S., Pillonel, L., Bosset, J. O., & Gremaud, G. (2004). Application of strontium isotope abundance ratios measured by MC-ICP-MS for food authentication. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19, 227–234.

Frank, H. A., Baranowski, J. D., Chongsiriwatana, M., Brust, P. A., & Premaratne, R. J. (1985). Identification and decarboxylase activities of bacteria isolated from decomposed mahimahi (*Coryphaena hippurus*) after incubation at 0 and 32°C. *International Journal of Food Microbiology*, 2, 331-340.

Frank, J. F., & Koffi, R. A. (1990). Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal of Food Protection*, 53, 550-554.

Franke, B. M., Gremaud, G., Hadorn, R., & Kreuzer, G. (2005). Geographical origin of meat- elements of an analytical approach to its authentication. *European Food Research and Technology*, 221, 493-503.

Franke, B.M., Koslitz, S., Micaux, F., Piantini, U., Maury, V., Pfammatter, E., Wunderli, S., Gremaud, G., Bosset, J. O., Hadorn, R., & Kreuzer, M. (2008). Tracing the geographic origin of poultry meat and dried beef with oxygen and strontium isotope ratios. *European Food Research and Technology*, 226, 761-769.

- Fras, S., Conde, J. E., Rodriguez-Bencomo, J. J., Garca-Montelongo, F., & Perez-Trujillo, J. P. (2003). Classification of commercial wines from the Canary Island (Spain) by chemometric techniques using metallic content. *Talanta*, 59, 335-344.
- Freitas, A. L., & Barth, A. L. (2004). Typing of *Pseudomonas aeruginosa* from hospitalised patients: a comparison of susceptibility and biochemical profiles with genotype. *Brazillian Journal of Medical and Biological Research*, 37, 77-82.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Rorestier, N., Teyssier-Cuvelle, S., Gillet, F., Aragno, M., & Rossi, P. (2002). Statistic analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns: A review. *Environmental Microbiology*, 4, 634-643.
- Fujioka, R. S., Tenno, K., & Kansako, S. (1988). Naturally occurring fecal coliforms and fecal streptococci in Hawaii's freshwater streams. *Toxic Assessment*, 3, 613-630.

G

- Garry, P., Andersen, T., Vendeuvre, J. L., & Bellon-Fontaine, M. N. (1995). Influence de la rugosité de surfaces en polyuréthane sur l'adhésion de *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*. In : Bellon-Fontaine, M. N., & Fourniat, J. (Eds). *Adhésion des micro-organismes aux surfaces*. Technique et Documentation, Paris, pp 21-30.
- Gassem, M. A. A. (2002). A microbiological study of sobia: a fermented beverage in the western province of Saudi Arabia. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 18, 173-177.
- Gavini, F., Mergaert, J., Beji, A., Mielcarek, C., Izard, D., Kersters, K., & De Ley, J. (1989). Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1988) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39, 337-345.
- Geiges, O. (1996). Microbial process in frozen food. *Advances in Space Research*, 18, 109-118.
- Genersch, E., & Otten, C. (2003). The use of repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) for genetic subtyping of German field isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. *Apidologie*, 34, 195-206.
- Genin, N., & René, F. (1995). Analyse de rôle de la transition vitreuse dans les procédés de conservation agro-alimentaire. *Journal of Food Engineering*, 26, 391-408.

- Georgala, D. L., & Hurst, A. (1963). The survival of food poisoning bacteria in frozen foods. *Journal of Applied Bacteriology*, 26, 346-358.
- Georghiou, P. R., Doggett, A. M., Kielhofner, M. A., Stout, J. E., Watson, D. A., Lupski, J. R., & Hamill, R. J. (1994). Molecular fingerprinting of *Legionella* species with repetitive element PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 2989-2994.
- Gérard, A., Larroque, M., Montet, D., Puygrenier, M., Temple, H., & Viruega, J. L. (2004). Le nouveau droit alimentaire européen : précaution, traçabilité, sécurité. Mon éditeur.com, Sète, France.
- Gilbey, J., Verspoor, E., McLay, A., & Houlihan, D. (2004). A microsatellite linkage map for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Animal Genetics*, 35, 98-105.
- Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E., & RingØ, E. (1997). Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia*, 352, 279-285.
- Gilbert, J. A., Hill, P. J., Dodd, C. E., & Laybourn-Parry, J. (2004). Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria. *Microbiology*, 150, 171-180.
- Giovannacci, I., Ragimbeau, C., Queguiner, S., Salvat, G., Vendeuvre, J. L., Carlier, V., Ermel, G. (1999). *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *International Journal of Food Microbiology*, 53, 127-140.
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 215-222.
- Giovambattista, G., Ripoli, M.V., De Luca, J. C., Mirol, P.M., Lirón, J. P., & Dulout, F. N. (2000). Male-mediated introgression of *Bos indicus* genes into Argentine and Bolivian creole cattle breeds. *Animal Genetics*, 31, 302-305.
- Giovannoni, S. J., Britschgi, T. B., Moyer, C. L., & Field, K. G. (1990). Genetic diversity in Sargasso sea bacterioplankton. *Nature*, 345, 60-63.
- Glaser, P. (2005). Les puces à AND vont-elles révolutionner l'identification des bactéries. *Medecine Sciences*, 21, 539-544.
- Glaubitz, J. C., Rhodes, E., & De Woody, A. (2003). Prospects for inferring pairwise relationships with single nucleotide polymorphisms. *Molecular Ecology*, 12, 1039-1047.
- Globefish (2006). Production Seabass (*Dicentrarchus labrax*): World.
http://www.globefish.org/billeder/1_3265.jpg

- Gonzalez, C. J., Santos, J. A., Garcia-Lopez, M. L., Gonzalez, N., & Otero, A. (2001). Mesophilic aeromonads in wild and aquacultured fresh water fish. *Journal of Food Protection*, 64, 687-691.
- Gooch, J. A., DePaola, A., Bowers, J., & Marshall, D. L. (2002). Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in post harvest American oysters. *Journal of Food Protection*, 65, 970-974.
- Goodchild, A., Sauders, N. F., Ertan, H., Raftery, M., Guihauss, M., Curmi, P. M., & Cavicchioli, R. (2004). A proteomic determination of cold adaptation in the Antarctic archaeon, *Methanococcoides burtonii*. *Molecular Microbiology*, 53, 309-321.
- Goodner, K.L., Baldwin, E. A., Jordán, M.J., & Shaw, P. E. (2000). The comparison of an electronic nose and gas chromatograph for differentiating NFC orange juice. *Proceeding of the Florida State Horticultural Society*, 113, 304-306.
- Gram, L., Wedell-Neergaard, C., & Huss, H. H. (1990). The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*). *International Journal of Food Microbiology*, 10, 303-316.
- Gram, L., & Melchiorson, J. (1996). Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas* spp. and *S. putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue. *Journal of Applied Bacteriology*, 80, 589-595.
- Gram, L., & Dalgaard, P. (2000). Fish spoilage bacteria-problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 262-266.
- Grecz, N., & El-Zawahry, Y. A. (1984). Effect of radiation and freezing on [³H]DNA of *Yersinia enterocolitica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 1111-1105
- Green, R., & Hy, M. (2002). La traçabilité : un instrument de la sécurité alimentaire. *Agroalimentaria*, 7, 19-28.
- Greene, A. K., Few, B. K., & Serafini, J. C. (1993). A comparison of ozonation and chlorination for the disinfection of stainless steel surfaces. *Journal of Dairy Science*, 76, 3617-3620.
- Gretsch, C., Toury, A., Estebanans, R., & Liardon, R. (1998). Sensitivity of metal oxide sensors towards coffee aroma. *Seminar in Food Analysis*, 3, 37-42.
- Grisez, L., Reyniers, J., Verdonck, L., Swings, J., & Ollevier, F. (1997). Dominant intestinal microbiota of sea bream and sea bass larvae from two hatcheries, during larval development. *Aquaculture*, 155, 387-399.

- Grobe, S., Wingender, J., & Flemming, H. C (2001). Capability of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to survive in chlorinated water. *International Journal of Hygiene and environmental Health*, 204, 139-142.
- Grundman, H., Schneider, C., Hartung, D., Daschner, F.D., & Pitt, T. L. (1995). Discriminatory power of three DANN-based typing technique of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 528-534.
- Guardabassi, L., Petersen, A., Olsen, J. E., & Dalsgaard, A. (1998). Antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. isolated from sewers receiving waste effluent from a hospital and a pharmaceutical plant. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3499-3502.
- Guardabassi, L., Dalsgaard, A., & Olsen, J. E. (1999). Phenotypic characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolated from aquatic sources. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 659-667.
- Guðbjörnsdóttir, B., Einarsson, H., & Thorkelsson, G. (2005). Microbial adhesion to processing lines for fish fillets and cooked shrimp: Influence of stainless steel surface finish and presence of Gram-negative bacteria on the attachment of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology and Biotechnology*, 43, 55-61.
- Guiraud, J. P. (1998). Microbiologie Alimentaire. Dunod/RIA. Paris, 696 p.

H

- Hafiane, A., & Ravaoarinoro, M. (2008). Différentes méthodes de typage des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées des patients atteints de mucoviscidose. *Médecine et maladies infectieuses*, 38, 238-247.
- Hancock, J. M., Tautz, D., & Dover, G. A. (1988). Evolution of the secondary structures and compensatory mutations of the ribosomal RNAs of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution*, 5, 393-414.
- Hanna, M. O., Smith, G.C., Savell, J. W., McKeith, F.K., & Vanderzantand, C. (1982). Microbial flora of livers, kidneys and hearts from beef, pork and lamb: effects of refrigeration, freezing and thawing. *Journal of Food Protection*, 45, 63-73.
- Handschr, M., Pinar, G., Gallist, B., Lubitz, W., & Haslberger, A. G. (2005). Culture free DGGE and cloning based monitoring of changes in bacterial communities of salad due to processing. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 1595-1605.
- Hansen, G. H., Strøm, E., Olafsen, J. A. (1992). Effect of different holding regimes on the intestinal microflora of herring (*Clupea harengus*) larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 461-470.

- Hansen, G. H., & Olafsen, J. A. (1999). Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microbial Ecology*, 38, 1-26.
- Hansen, M. C., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., & Molin, S. (1998). Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS Microbiology Ecology*, 26, 141-149.
- Hargreaves, N. B. (1992). An electronic hot-branding device for marking fish. *The Progressive Fish-Culturist*, 54, 99-104.
- Håstein, T., Hill, B. J., Berthe, F., & Lightner, D.V. (2001). Traceability of aquatic animals. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 20, 564-583.
- Hatai, K., Egusa, S., Nakajima, M., & Chikahata, H. (1975). *Pseudomonas chlororaphis* as a fish pathogen. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 41, 12-15.
- Hazen, T. (1988). Fecal coliforms as indicators in tropical waters: A review. *Toxic Assessment*, 3, 461-477.
- Hayashi, K. (1991). PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods and Applications*, 1, 34-38.
- Hayatsu, H., Pan, S. K., & Ukita, T. (1971). Reaction of sodium hypochlorite with nucleic acids and their constituents. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 19, 2189-2192.
- He, C., Chen, L., Simmons, M., Li, P., Kim, S., & Liu, Z. J. (2003). Putative SNP discovery in interspecific hybrids of catfish by comparative EST analysis. *Animal Genetics*, 34, 445-448.
- Hegerding, L., Seidler, D., Danneel, H.J., Gessler, A., & Nowak, B. (2002). Oxygen isotope-ratio-analysis for the determination of the origin of beef. *Fleischwirtschaft*, 82, 95-100.
- Helentjaris, T., Slocum, M., Wrigth, S., Schaefer, A., & Nienhuis, J. (1986). Construction of genetic maps in maize and tomato using restriction fragments length polymorphism. *Theoretical and Applied Genetics*, 72, 761-769.
- Herald, P. J., & Zottola, E. A. (1988). Scanning electron microscopy examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at selected temperatures and pH values. *Journal of Food Protection*, 51, 445-448.

- Herbinger, C. M., Newkirk, G. F., & Lanes, S. T. (1990). Individual marking of Atlantic salmon: evaluation of cold branding and jet injection of Alcian Blue in several fin locations. *Journal of Fish Biology*, 36, 99-101.
- Herman, L. (1997). Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* by PCR. *Food Microbiology*, 14, 103-110.
- Heydron, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersboll, B.K., & Molin, S. (2000). Quantification of biofilm structure by the nouvel computer program COMSTAT. *Microbiology*, 146, 2395-2407.
- Heyndrickx, M., Vauterin, L., Vandamme, P., Kersters, K., & De Vos, P. (1996). Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *Journal of Microbiological Methods*, 26, 247-259.
- Higgins, C. F., McLaren, R. S., & Newbury, S. F. (1988). Repetitive extragenic palindromic sequences, mRNA stability and gene expression: evolution by gene conversion? A review. *Gene*, 72, 3-14.
- Hobson, K. A. (1999). Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: A review. *Oecologia*, 120, 314–326.
- Holah, J. T (1995). Progress report on CEN/TC 216/working group 3: Disinfectant test methods for food hygiene, institutional, industrial and domestic applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 36, 273-279.
- Hörmansdorfer, S., Wentges, H., Neugebauer-Büchler, K., & Bauer, J. (2000). Isolation of *Vibrio alginolyticus* from seawater aquaria. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 203, 169-175.
- Horvat, M., Nolde, N., Fajon, V., Jereb, V., Logar, M., Lojen, S., Jacimovic, R., Falnoga, I., Liya, Q., Faganeli, J., & Drobne, D. (2003). Total mercury, methylmercury and selenium in mercury polluted areas in the province Guizhou, China. *The Science of the Total Environment*, 34, 231-256.
- Hoshino, Y.T., & Matsumoto, N. (2005). Skim milk drastically improves the efficacy of DNA extraction from Andisol, a volcanic ash soil. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 39, 247-252.
- Hossain, M. M., Uddin, M. N., Islam, M. N., Chakraborty, S. C., & Kamal, M. (1999). Study on the intestinal bacteria of *Labeo rohita* (Ham.). *Bangladesh Journal of Fisheries Research*, 3, 63-66.

- Hovda, M. B., Sivertsvik, M., Lunestad, B. T., Lorentzen, G., & Rosnes, J. T. (2007a). Characterisation of the dominant bacterial population in modified atmosphere packaged farmed halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) based on 16S rDNA-DGGE. *Food Microbiology*, 24, 362-371.
- Hovda, M. B., Lunestad, B. T., Sivertsvik, M., & Rosnes, J. T. (2007b). Characterization of the bacterial flora of modified atmosphere packaged farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*) by PCR-DGGE of conserved 16S rRNA gene regions. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 68-75.
- Hugas, M., Garriga, M., & Aymerich, M. T. (2003). Functionality of enterocci in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 223-233.
- Huillery, A. L. (2001). Analyse de la filière des poissons-chats (genre *Pangasius*) élevés dans le delta du Mékong (Vietnam). *Mémoire de fin d'études pour l'obtention du grade d'ingénieur INA-PG*, 106 p.
- Hulton, C. S., Higgins, C. F., & Sharp, P. M. (1991). ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology*, 5, 825-834.
- Hung, L. T., Nguyen, A. T., & Lazard, J. (2001). Effects of frequency and time of feeding on growth and feed utilization in two Asian catfishes, *Pangasius bocourti* (Sauvage, 1880) and *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878). *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 16, 171-184.
- Hung, L. T., Nguyen, A. T., Cacot, P., & Lazard, J. (2002). Larval rearing of the Asian catfish, *Pangasius bocourti*, Pangasiidae: alternative feeds and weaning time. *Aquaculture*, 212, 115-127.
- Huss, H. H. (1995a). Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical Paper 348*. Rome, 195 p.
- Huss, H. H. (1995b). Assurance of seafood quality. *FAO Fisheries Technical Paper 334*. Rome, 169 p.
- Huss, H. H., Reilly, A., & Ben Embarek, K. (2000). Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control*, 11, 149-156.
- Huss, H. H. (2003). Assessment and management of seafood safety and quality. *FAO Fisheries Technical Paper 444*. Rome, 230 p.
- Huys, G., Bartie, K., Cnockaert, M., Dang, T. H. O., Nguyen, T. P., Somsiri, T., Chinabut, S., Yusoff, F. M., Shariff, M., Giacomini, M., Teale, A., & Swings, J. (2007).

Biodiversity of chloramphenicol-resistant mesophilic heterotrophs from Southeast Asian aquaculture environments. *Research in Microbiology*, 158, 228-235.

I

Ibekwe, A. M., Papernik, S. K., Gan, J., Yates, S. R., Yang, C. H., Crowley, D. E. (2001). Impact of fumigants on soil microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3245-3257.

ISO 8402 :1984. Management de la qualité et assurance de la qualité. *Organisation Internationale de Normalisation*.

ISO 9000-2000. Système de management de la qualité- Principes essentiels et vocabulaires. *Organisation Internationale de Normalisation*.

Isonhood, J. H., & Drake, M. (2002). *Aeromonas* species in food. *Journal of Food Protection*, 65, 575-582.

Iversen, C., & Forsythe, S. J. (2003). Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends in Food Science and Technology*, 14, 443-454.

Iversen, C., & Forsythe, S. J. (2004). Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant milk and related products. *Food Microbiology*, 21, 771-777.

J

Jayasekara, N. Y., Heard, G. M., Cox, J. M., & Fleet, G. H. (1998). Population of pseudomonads and related bacteria associated with bottled non-carbonated mineral water. *Food Microbiology*, 15, 167-176.

Jemmi, T., & Keusch, A. (1992). Behaviour of *L. monocytogenes* during processing and storage of experimentally contaminated hot-smoked trout. *International Journal of Food Microbiology*, 15, 339-346.

Ji, N., Peng, B., Wang, G., Wang, S., & Peng, X. (2004). Universal primer PCR with DGGE for rapid detection of bacterial pathogens. *Journal of Microbiological Methods*, 57, 409-413.

Jia, J., & Davies, P. L. (2002). Antifreeze proteins: an unusual receptor-ligand interaction. *Trends in Biochemical Sciences*, 27, 101-106.

Jiménez, L., Munir, J., Toranzos, G. G., & Hazen, T.C. (1989). Survival and activity of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in tropical fresh water. *Journal of Applied Bacteriology*, 67, 61-69.

Johns, G. C., & Somero, G. N. (2004). Evolutionary convergence in adaptation of proteins to temperature: A4-lactate dehydrogenases of Pacific damselfishes (*Chromis* spp.). *Molecular Biology and Evolution*, 21, 314-320.

Josuweit, H. (2008). Tilapia market reports- September 2008.

<http://www.globefish.org/index.php?id=4590>

Jurkovic, D., Krizkova, L., Sojka, M., Belicová, A., Dusinsky, R., Krajcovic, J., Snauwaert, C., Naser, S., Vandamme, P., & Vancanneyt, M. (2006). Molecular identification and diversity of enterococci isolated from Slovak Bryndza cheese. *Journal of General and Applied Microbiology*, 52, 329-337.

K

Kandhai, M. C., Reij, M. W., Van Puyveld, K., Guillaume-Gentil, O., Beumer, R. R., & Van Schothorst, M. (2004). A new protocol for the detection of *Enterobacter sakazakii* applied to environmental samples. *Journal of Food Protection*, 67, 1267-1270.

Kawasaki, A., Oda, H., & Hirata, T. (2002). Determination of strontium isotope ratio of brown rice for estimating its provenance. *Soil Science and Plant Nutrition*, 48, 635–640.

Khalequzzaman, K. M., Jinnah, M. A., Rashid, M. A. A. M., Chowdhury, M. N. A., & Alam, M. (2002). Effect of *Pseudomonas fluorescens* in controlling bacterial wilt of tomato. *Plant Pathology Journal*, 1, 71-73.

Keynan, Y., & Rubinstein, E. (2007). The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30, 385-389.

Kharazmi, A., Giwerman, B., Høiby, N. (1999). Robbins device in biofilm research. In: Doyle, R. J. (Eds). *Methods in Enzymology*, 210. Academic Press, London, pp 207-215.

Kim, K. Y., Jordan, D., & McDonald, G. A. (1998). *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilizing bacteria, and microbiol activity in soil: effect of carbon sources. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 995-1003.

Kim, J., & Marshall, D. L. (2000). Catfish skin mucus affects lactic acid inactivation of attached *Salmonella typhimurium*. *Journal of Food Safety*, 20, 53-64.

Kim, S. H., Field, K. G., Morrissey, M.T., Price, R.J., Wei, C., & An, H. (2001). Source and identification of histamine-producing bacteria from fresh and temperature-abused albacore. *Journal of Food Protection*, 64, 1035-1044.

- Kim, S. H., & Wei, C. I. (2007). Antibiotic resistance and Caco-2 cell invasion of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from farm environments and retail products. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 356-363.
- Kimura, M. (1968). Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, 217, 624-626.
- Kirov, S. M., Anderson, M. J., & McMeekin, T. A. (2008). A note on *Aeromonas* spp. from chickens as possible food-borne pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 68, 327-334.
- Kobayashi, T., Imai, M., Ishitaka, Y., & Kawaguchi, Y. (2000). Histopathological studies of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis* (Temminck and Schlegel). *Journal of Fish Diseases*, 27, 451-457.
- Kocher, T. D., Lee, W., Sobolewska, H., Penman, D., & McAndrew, B. (1998). A genetic linkage map of a cichlid fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics*, 148, 1225-1232.
- Kopczynski, E. D., Bateson, M. M., & Ward, D. M. (1994). Recognition of chimeric small-subunit ribosomal DNAs composed of genes from uncultivated microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 746-748.
- Kowalchuk, G. A., Stephen, J. R., De Boer, W., Prosser, J. I., Embley, T. M., & Woldendorp, J. W. (1997). Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR- amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3176-3181.
- Knockaert, C. (1990). Le fumage du poisson. Valorisation des produits de la mer. *Ifremer*, 151 p.
- Knowles, S. O., Grace, N. D., Knight, T. W., McNabb, W. C., & Lee, J. (2006). Reasons and means for manipulating the micronutrient composition of milk from grazing dairy cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 131, 154-167.
- Kume, T., Chosdu, R., Ito, H., & Takehisa, M. (1983). Effect of Gamma-irradiation on fish meal. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47, 723-727.
- Kuske, C. R., Banton, K. L., Adorada, D. L., Stark, P. C., Hill, K. K., & Jackson, P. J. (1998). Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2463-2472.
- Kvasnikov, E. I., Kovalenko, N.K., & Materinskaya, L. G. (1977). Lactic acid bacteria of fresh water fish. *Mikrobiologiya*, 46, 619-624.

L

- LaCroix, S.J., & Cabelli, V.J. (1982). Membrane filter method for enumeration of *Acinetobacter calcoaceticus* from environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 90-96.
- Ladhani, S., & Bhutta, Z.A. (1998). Neonatal *Pseudomonas putida* infection presenting as staphylococcal scalded skin syndrome. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 17, 642-644.
- Lakshmanan, R., Jeya Shakila, R., & Jeyasekaran, G. (2002a). Changes in the halophilic amine forming bacterial flora during salt-drying of sardines (*Sardinella gibbosa*). *Food Research International*, 35, 541-546.
- Lakshmanan, R., Jeya Shakila, R., & Jeyasekaran, G. (2002b). Survival of amine-forming bacteria during the ice storage of fish and shrimp. *Food Microbiology*, 19, 617-625.
- Lambert, R. J. W., & Johnston, M. D. (2001). The effect of interfering substances on the disinfection process: a mathematic model. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 548-555.
- Landini, P., & Zehnder, A.J. (2002). The global regulatory hns gene negatively affects adhesion to solid surfaces by anaerobically grown *Escherichia coli* by modulating of flagellar genes and lypopolysaccharide production. *Journal of Bacteriology*, 184, 1522-1529.
- Landy, E. T., Mitchell, J. I., Hotchkiss, S., & Eaton, R. A. (2007). Bacterial diversity associated with archaeological waterlogged wood: Ribosomal RNA clone libraries and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61, 106-116.
- Larsen, J. L., & Jensen, N. J. (1977). An *Aeromonas* species implicated in ulcer-disease of the cod (*Gadus morhua*). *Nordisk Veterinaermedicin*, 29, 199-211.
- Larsen, J. L., Jensen, N. C., & Christensen, N. O. (1978). Water pollution and the ulcer syndrome in the cod (*Gadus morhua*). *Veterinary Research Communications*, 2, 207-216.
- Lazard, J., & Cacot, P. (1997). Système de production aquacole au Vietnam: situation, perspectives et enjeux de recherche. *Agriculture et développement*, 15, 127-136.
- Le, T. H., Huynh Pham, V. H., Nguyen, T. T. T., & Lazard, J. (2006). Home-made feed or commercially formulated feed for *Pangasius* catfish culture in Viet Nam?

Present status and future development. In: *International Symposium of Nutrition and Fish Feeding*. Biarritz, France.

Leathart, J. B. S., & Gally, D. L. (1998). Regulation of type 1 fimbrial expression in uropathogenic *Escherichia coli*: heterogeneity of expression through sequence changes in the fim switch region. *Molecular Microbiology*, 28, 371-381.

Lebaron, P., Servais, P., Troussellier, M., Courties, C., Vives-Rego, J., Muyzer, G., Bernard, L., Guindulain, T., Schäfer, H., & Stackebrandt, E. (1999). Changes in bacterial community structure in seawater mesocosms differing in their nutrient status. *Aquatic Microbial Ecology*, 19, 255-267.

Lee, A., Smith, S. C., & Coloe, P. J. (1998). Survival and growth of *Campylobacter jejuni* after artificial inoculation onto chicken skin as a function of temperature and packaging conditions. *Journal of Food Protection*, 61, 1609-1614.

Leensing, R. (2005). Identification et validation de marqueurs spécifiques pour la traçabilité de poisons d'aquaculture lors de leur import/export. Thèse de doctorat. Université Montpellier 2, France, 183 p.

Lemanceau, P. (1992). Beneficial effects of rhizobacteria on plants : example of fluorescent *Pseudomonas* spp. *Agronomie*, 12, 413-437.

Le Nguyen, D. D., Ha, N. H., Dijoux, D., Loiseau, G., & Montet, D. (2008a). Determination of fish origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE : An application on *Pangasius* fish from Vietnam. *Food Control*, 19, 454-460.

Le Nguyen, D. D., Gemrot, E., Loiseau, G., & Montet, D. (2008b). Determination of citrus fruit origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE : an application to clementine from Morocco and Spain. *Fruit*, 63, 75-84.

Lerman, L.S., Fisher, S.G., Hurley, I., Silverstain, K., & Lumelsky, N. (1984). Sequence-determined DNA separations. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 13, 399-423.

Liesack, W., Weyland, H., & Stackebrandt, E. (1991). Potential risk of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed culture of strict barophilic bacteria. *Microbial Ecology*, 21, 191-198.

Lin, J., Lee, I. S., Frey, J., Slonczewski, J. L., & Foster, J. W. (1995). Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 177, 4097-4104.

- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362, 709-715.
- Liston, J. (1980). Microbiology in fishery science. In: Connell, J. J. (Eds). *Advances in Fishery Science and Technology*. Fishing News Books, Farham, England, pp 138-157.
- Litopoulou-Tzanetaki, E., & Vafopoulou-Mastrojiannaki, A. (1995). Hydrolase activities of whole cells and crude cell-free extract of gram-negative isolates from refrigerated raw ewe milk. *Milchwissenschaft*, 50, 610-614.
- Little, B. J., Wagner, P., Maki, J. S., Walch, M. & Mitchell, R. (1986). Factors influencing the adhesion of microorganisms to surface. *The Journal of Adhesion*, 20, 187-210.
- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., Forney, L. J. (1997). Characterisation of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4516-4522.
- Liu, X-c., Zhang, Y., Yang, M., Wang, Z-y., & Lu, W-z. (2006). Analysis of bacterial community structures in two sewage treatment plants with different sludge properties and treatment performance by nested PCR-DGGE method. *Journal of Environmental Science*, 19, 60-66.
- Loftus, R. T., MAchug, D. E., Ngere, L. O., Balian, D. S., Badi, A. M., Bradley, D. G., & Cunningham, E. P. (1994). Mitochondrial genetic variation in European, African and Indian cattle populations. *Animal genetics*, 25, 265-271.
- Lombardi, G., Luzzaro, F., Docquier, J. D., Riccio, M. L., Perili, M., Coli, A., Amicosante, G., Rossolini, G. M., & Toniolo, A. (2002). Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo- β -lactamase. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 4051-4055.
- Lopez-Sabater, E. J., Rodriguez-Jerez, J. J., Roig-Sagues, A. X., & Mora-Ventura, M. A. T. (1994). Bacteriological quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for canning: effect of tuna handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level. *Journal of Food Protection*, 57, 318-323.
- Loutit, J.S., & Tompkins, L.S. (1991). Restriction enzyme and southern hybridization analyses of *Pseudomonas aeruginosa* strains from patient with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 5644-5649.
- Lows, F. J., Fullbright, D. W., Stephens, C. T., & De Bruijn, F. J. (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars

- and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2286-2295.
- Louws, F. J., Bell, J., Medina-Mora, C. M., Smart, C. D., Opgenorth, D., Ishimaru, C. A., Hausbeck, M. K., De Bruijn, F. J., & Fulbright, D. W. (1998). Rep-PCR mediated genomic fingerprinting: A rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology*, 88, 862-868.
- Lowe-McConnell, R. H. (1982). Tilapia in fish communities. In: Pullin R.S.V. & Lowe-McConnell, R. H. (Eds). *The biology and culture of tilapias. ICLARM conference proceeding N° 7*, International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines, pp 83-113.
- Lu, C.P. (1992). Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish diseases caused by it. *Journal Fisheries of China*, 16, 282-288.
- Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1994). Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 15, 155-173.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M., & Schleifer, K. H. (1998). Bacterial phylogeny based on comparative sequences analysis. *Electrophoresis*, 19, 554-568.
- Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1999). Phylogeny of bacteria beyond the 16S rRNA standard. *American Society for Microbiology News*, 65, 752-757.
- Lukow, T., Dunfield, P.F., & Liesack, W. (2000). Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 32, 241-247.
- Lupski, J. R., & Weinstock, G. M. (1992). Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *Journal of Bacteriology*, 174, 4525-4529.
- Lund, B.M. (2000). Freezing. In: Lund, B. M., Baird Parker, T. C., & Gould, G. W. (Eds). *The Microbiological Safety and Quality of Food, Volume I*. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, pp. 122-145.
- Lyautey, E., Lacoste, B., Ten-Hage, L., Rols, J-L., Garabetian, F. (2005). Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16S rDNA PCR-DGGE: methodological settings and fingerprints interpretation. *Water Research*, 39, 380-388.

M

- Ma, J., Straub, T. M., Pepper, I. L., & Gerba, C. P. (1994). Cell culture and PCR determination of poliovirus inactivation by disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4203-4206.
- MacDonald, N. L., Stark, J.R., & Austin, B. (1986). Bacterial microflora in the gastrointestinal tract of Dover sole (*Solea solea* L.), with emphasis on the possible role of bacteria in the nutrition of the host. *FEMS Microbiology Letters*, 35, 107-111.
- Mackey, B. M., Derrick, C. M., & Thomas, J. A. (1980). The recovery of sub-lethally injured *Escherichia coli* from frozen meat. *Journal of Applied Bacteriology*, 48, 315-324.
- Mafu, A. A., Roy, D., Goulet, J., & Magny, P. (1990). Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection*, 53, 742-746.
- Mahenthiralingham, E., Campbell, M. E., Foster, J., Lam, J.S., & Speert, D. P. (1996). Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 1129-1135.
- Mahmoud, B. S. M., Yamazaki, K., Miyashita, K., Il-Shik, S., Dong-Suk, C., & Suzuki, T. (2004). Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiology*, 21, 657-666.
- Manca, G., Camin, F., Coloru, G. C., Del Caro, A., Depentori, D., & Franco, M. A. (2001). Characterization of the geographical origin of Pecorino Sardo cheese by casein stable isotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) ratios and free amino acid ratios. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1404–1409.
- Manca, G., Franco, M., Versini, G., Camin, F., Rossmann, A., & Tola, A. (2006). Correlation between multielement stable isotope ratio and geographical origin in Peretta cow's milk cheese. *Journal of Dairy Science*, 89, 831-839.
- Mancuso Nichols, C. A., Lardi re, S. G., Bowman, J. P., Nichols, P.D., Gibson, J. A. E., & Gu zennec, J. (2005a). Chemical characterization of exopolysaccharides from Antarctic marine bacteria. *Microbial Ecology*, 49, 578-589.
- Mancuso Nichols, C. A., Gu zennec, J., & Bowmann, J. P. (2005b). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: a review. *Marine Biotechnology*, 7, 253-271.

- Marcos, A., Fisher, A., Rea, G., & Hill, S. J. (1998). Preliminary study using trace element concentrations and a chemometrics approach to determine the geographical origin of tea. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 13, 521-525.
- Martínez-Murcia, A.J., Acinas, S.G., & Rodríguez-Valera, F. (1995). Evaluation of prokaryotic diversity by restrictase digestion of 16S rDNA directly amplified from hypersaline environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 17, 247-256.
- Masters, C. I., Shallcross, J. A., Mackey, B. M. (1994). Effect of stress treatments on the detection of *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *Journal of Applied Bacteriology*, 77, 73-79.
- Mauriello, G., Moio, L., Genovese, A., & Ecolini, D. (2003). Relationship between flavouring capabilities, bacterial composition and geographical origin of Natural Whey Cultures (NWCs) used for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. *Journal of Dairy Science*, 86, 486-497.
- Mayer, K. H., & Zinner, S. H. (1985). Bacterial pathogens of increasing significance in hospital-acquired infections. *Reviews of Infectious Diseases*, 7, (Supplement 3), S371- S 379.
- Mc Bain, A. J., Bartolo, R. G., Catrenich, C. E., Charbonneau, D., Ledder, R. G., & Gilbert, P. (2003). Growth and molecular characterization of dental plaque microcosms. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 655-664.
- McDonald, J. G., & Wong, E. (2001). Use of a monoclonal antibody and genomic fingerprinting by repetitive-sequence-based polymerase chain reaction to identify *Xanthomonas populi* pathovars. *The Canadian Journal of Plant Pathology*, 23, 47-51.
- McDonnell, G., & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 149-179.
- McKillip, J. L., Jaykus, L. A., & Drake, M. (1999). Nucleic acid persistence in heat-killed *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated skim milk. *Journal of Food Protection*, 62, 839-844.
- McLellan, S. L., Daniels, A. D., & Salmore, A. K. (2003). Genetic characterization of *Escherichia coli* populations from host sources of fecal pollution by using DNA fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2587-2594.
- Miambi, E., Guyot, J. P., & Ampe, F. (2003). Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 111-120.

- Michiels, C. W., Schellekens, M., Soontjens, C. C. F., & Hauben, K. J. A. (1997). Molecular and metabolic typing of resident and transient fluorescent pseudomonad flora from a meat mincer. *Journal of Food Protection*, 60, 1515-1519.
- Miettinen, M., Björkroth, K.J., & Korkeala, H. (1999). Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 46, 187-192.
- Miles, C. A., Mackey, B. M., & Parsons, S. E. (1986). Differential scanning calorimetry of bacteria. *Journal of General Microbiology*, 132, 939-952.
- Miranda, C. D., & Zemelman, R. (2001). Antibiotic resistance bacteria in fish from the Concepción Bay, Chile. *Marine Pollution Bulletin*, 42, 1096-1102.
- Miranda, C.D., & Zemelman, R. (2002). Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture*, 212, 31-47.
- Miranda, C.D., & Rojas, R. (2007). Occurrence of florfenicol resistance in bacteria associated with two Chilean salmon farms with different history of antibacterial usage. *Aquaculture*, 266, 39-46.
- Moeseneder, M. M., Arrieta, J. M., Muyzer, G., Winter, C., & Herndl, G. J. (1999). Optimization of terminal-restriction length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 5318-5325.
- Moletta, M., Delgenes, J-P., & Godon, J-J. (2007). Differences in the aerosolization behavior of microorganisms as revealed through their transport by biogas. *Science of the Total Environment*, 379, 75-88.
- Momba, M. N. B., Cloete, T. E., Venter, S.N., & Kfir, R. (1999). Examination of the behaviour of *Escherichia coli* in biofilms established in laboratory scale units receiving chlorinated and chloraminated water. *Water Research*, 33, 2937-2940.
- Montet, D. (2003). Un « code barre » biologique pour les poissons d'Asie du Sud-Est. Tracenews net : <http://www.tracenews.net/dossiers/codebarre2.php>
- Montet, D. (2004). Introduction à la traçabilité. In: Tiré du rapport et avis du Conseil national de l'alimentation sur la traçabilité des denrées alimentaires. Montpellier, 24 p.
- Moore, P. B. (1998). The three-dimensional structure of the ribosome and its components. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 27, 35-58.
- Mossel, D. A. A., Corry, J. E. L., Sruijt, C. B., Baird, R. M. (1995). Essentials of the microbiology of foods. Willer, New York, pp 63-109.

- Moura, A., Tacão, M., Henriques, M., Dias, J., Ferreira, P., Correira, A. (2007). Characterization of bacterial diversity in two aerated lagoons of a waste water treatment plant using PCR-DGGE analysis. *Microbiological Research*. Article in press.
- Moyer, C. L., Dobbs, F. C., & Karl, D. M. (1994). Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 871-879.
- Mulack, V., Becel, P., & Tailliez, R. (1992). Bactériologie des produits de la mer: caractérisation des flores bactériennes après traitement thermique. *Sciences des aliments*, 12, 415-428.
- Muntada-Garriga, J. M., Rodriguez-Jerez, J. J., Lopez-Sabater, E. I., & Mora-Ventura, M. (1995). Effect of chill and freezing on survival of *Vibrio parahaemolyticus* inoculated in homogenates of oyster meat. *Letters in Applied Microbiology*, 20, 225-227.
- Muroga, K., Higashi, M., & Keitoku, H. (1987). The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture*, 65, 79-88.
- Murray, A. E., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695-700.
- Murry, M. A., Zhang, D., Schneider, M., De Bruijn, F. J. (1995). Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction (rep-PCR) to fingerprint the genomes of *Frankia* isolates. *Symbiosis*, 19, 223-240.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695-700.
- Muyzer, G., Hottenträger, S., Teske, A., & Wawer, C. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA- A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In: Akkermans, A. D. L., Van

Elsas, J. D., & De Bruijn, F. J. (Eds). *Molecular microbiol ecology manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 1-23.

Myers, R. M. Fischer, S. G., Lerman, L. S., & Maniatis, T. (1985). Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 13, 3131-3145.

Myyazaki, T., & Kaige, N. (1986). A histopathological study on motile aeromonad disease of crucian carp. *Fish Pathology*, 21, 181-185.

N

Nakano, J., Kameyama, T., Venkateswaran, K., Kawakami, J., & Hashimoto, J. (1990). Distribution and characterisation of haemolytic and enteropathogenic motile *Aeromonas* in aquatic environment. *Microbiology and Immunology*, 34, 447-458.

Nascumento, D. R., Vieira, R. H., Almeida, H. B., Patel, T. R., & Iaria, S. T. (1998). Survival of *Vibrio cholerae* strains in shrimp subjected to freezing and boiling. *Journal of Food Protection*, 61, 1317-1320.

NCBI : National Center for Biotechnology Information databases

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Nguyen, T. P. L., Dalsgaard, A., Phung, D. C., & Mara, D. (2007). Microbiological quality of fish grown in wastewater-fed and non-wastewater-fed fishponds in Hanoi, Vietnam: influence of hygiene practices in local retail markets. *Journal of Water and Health*, 5, 209-218.

Nieto, T. P., Toranzo, A. E., & Barja, J. L. (1984). Comparison between the bacterial flora associated with fingerling rainbow trout cultured in two different hatcheries in the northwest of Spain. *Aquaculture*, 42, 193-206.

Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., Bylund, G. (2001). Protection of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture*, 198, 229-236.

Nogva, H. K., Bergh, A., Holck, A., & Rudi, K. (2000). Application of the 5'-nuclease PCR assay in evaluation and development methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4029-4036.

Noller, H. F., & Woese, C. R. (1981). Secondary structure of 16S ribosomal RNA. *Science*, 212, 403-411.

Nübel, U., Engelen, B., Fleske, A., Snadir, J., Wieshuber, A., Amann, R., Ludwig, W., & Backhaus, H. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in

Paenibacillus polymyxa detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 178, 5636-5643.

O

Ogbondeminu, F. S., & Olayemi, A. B. (1993). Antibiotic resistance in enteric bacterial isolates from fish and water media. *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 8, 207-212.

Okpokwasili, G.C., & Alapiki, A.M. (1990). Bacterial flora associated with a Nigerian freshwater fish culture. *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 5, 87-90.

Oksuz, A., Evrendilek, G. A., Calis, M. S., & Orezen, A. (2008). Production of a dry sausage from African catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell, 1822): microbial, chemical and sensory evaluations. *International Journal of Food Science & Technology*, 43, 166-172.

Olge, J. W., Janda, J. M., Woods, D. E., & Vasil, M. L. (1987). Characterization and use of a DNA probe as an epidemiological marker for *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Infectious Disease*, 155, 119-126.

Olive, M. D., & Bean, P. (1999). Principles and applications of methods for DNA base typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 1661-1669.

Olson, V. M., Swaminathan, B., Pratt, D. E., & Stadelman, W. J. (1981). Effect of five cycle rapid freeze-thaw treatment in conjunction with various chemicals for the reduction of *Salmonella typhimurium*. *Poultry Science*, 60, 1822-1826.

Opelt, K., & Berg, G., (2004). Diversity and antagonistic potential of bacteria associated with bryophytes from nutrient-poor habitats of the Baltic Sea coast. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 6569-6579.

Opstvedt, J., Aksnes, A., Hope, B., & Pike, I. H. (2003). Efficiency of feed utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with increasing substitution of fish meal with vegetable proteins. *Aquaculture*, 221, 365-379.

Øvreas, L., Forney, L., Daae, F. L., & Torsvik, V. (1997). Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet, as determined by denaturing gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3367-3373.

P

Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J., & Olsen, G. J. (1986). The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Advances in Microbial Ecology*, 9, 1-55.

- Palmen, R., & Hellingwerf, K. J. (1995). *Acinetobacter calcoaceticus* liberates chromosomal DNA during induction of competence by cell lysis. *Current Microbiology*, 30, 7-10.
- Panoff, J. M., Thammavongs, B., Guéguen, M., & Boutibonnes, P. (1998). Cold stress response in mesophilic bacteria. *Cryobiology*, 36, 75-83.
- Panoff, J. M., Thammavongs, B., & Guéguen, M. (2000). Cryotolerance and cold stress in lactic acid bacteria. *Sciences des Aliments*, 20, 105-110.
- Park, J. I., Grant, C. M., Davies, M. J., & Dawes, I. (1998). The cytoplasmic Cu, Zn superoxide dismutase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for resistance to freeze-thaw stress: generation of free radicals during freezing and thawing. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 22921-22928.
- Parker, R. W., Maurer, E. M., Childers, A. B., & Lewis, D. H. (1994). Effect of frozen storage and vacuum packaging on survival of *Vibrio vulnificus* in Gulf Coast oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Food Protection*, 57, 604-606.
- Patsias, A., Badeka, A. V., Savvaidis, I. N., & Kontominas, M. G. (2008). Combined effect of freeze chilling and MAP on quality parameters of raw chicken fillets. *Food Microbiology*, 25, 575-581.
- Peek, A. S., Souza, V., Eguiarte, L. E., & Gaut, B. S. (2001). The interaction of protein structure, selection, and recombination on the evolution of the type-1 fimbrial major subunit (*fimA*) from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Evolution*, 52, 193-204.
- Pellon, J. R., & Sinskey, A. J. (1984). Heat induced damage to the bacterial chromosome and its repair. *Society for Applied Bacteriology Technical Series*, 12, 105-125.
- Penders, J., & Stobberingh, E. E. (2008). Antibiotic resistance of motile aeromonads in indoor catfish and eel farms in the southern part of The Netherlands. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31, 261-265.
- Pendurkar, S. H., Kulkarni, P. R. (1990). Heat resistance of *Bacillus* spores exposed to food processing conditions. *Nahrung*, 34, 177-180.
- Pereira, F., Ravelo, C., Toranzo, A. E. & Romalde, J. L. (2004). *Lactococcus garvieae*, an emerging pathogen for the Portuguese trout culture. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 24, 274-279.

- Picque, D., Cattenos, T., Trelea, C., Cuinier, C., & Corrieu, G. (2002). Classification géographique de vins rouges par analyse de leur extrait sec en spectroscopie moyen infrarouge à transmission. *Bulletin de l'OIV*, 75, 809-822.
- Piper, P. W. (1993). Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 11, 339-355.
- Pfeifer, H. R., Derron, M-H., Rey, D., Schlegel, C., Atteia, O., Dalla Piazza, R., Dubois, J. P., & Mandia, Y. (2000). Natural trace element input to the soil-sediement-water plant system: examples of background and contaminated situations in Switzeland, Eastern France and Northern Italy. In: Market, B., Friese, K. (Eds). *Trace elements-Their distribution and effect in the environment*. Elsevier, Amsterdam, pp 33-86.
- Phadtare, S., Alsina, J., & Inouye, M. (1999). Cold-shock response and cold-shock proteins. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 175-180.
- Phadtare, S. (2004). Recent developments in bacterial cold-shock response. *Current Issues in Molecular Biology*, 6, 125-136.
- Phung, N. T., Lee, J., Kang, K. H., Chang, I. S., Gadd, G. M., & Kim, B. H. (2004). Analysis of microbial diversity in oligotrophic microbial fuel cells using 16S rDNA sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 233, 77-82.
- Pinhassi, J., Sala, M.M., Havskum, H., Peters, F., Guadayol, O., Malits, A., & Marrasé, C. (2004). Changes in Bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 6753-6766.
- Pitt, T. L. (1988). Epidemiological typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 7, 238-247.
- Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 589-603
- Poffe, R., & Op de Beeck, E. (1991). Enumeration of *Aeromonas hydrophila* from domestic wastewater treatment plans and surface water. *Journal of Applied Bacteriology*, 71, 366-370.
- Poligné, I., & Collignan, A. (2000). Quick marination of anchovies (*Engraulis encrasicolus*) using acetic and gluconic acids. Quality and stability of the end product. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 33, 202-209.
- Portetelle, D., Haezebroeck, V., Mortiaux, F., & Renaville, R. (2000). Traçabilité dans la filière animale. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 4, 233-240.

- Potter, N. N. (1986). Cold preservation and processing. In: Potter, N. N. (Eds). Food Science. AVI Publishing, Westport, CT, pp 201-245.
- Pouyaud, L., Teugels, G., Gustiano, R., & Legengre, M. (2000). Contribution of the phylogeny of pangasiid catfishes base don allozymes and mitochondrial DNA. *Journal of Fish Biology*, 56, 1509-1538.
- Poysky, F. T., Paranjpye, R. N., Peterson, M. E., Pelroy, G. A., Guttman, A. E., & Eklund, M. W. (1997). Inactivation of *Listeria monocytogenes* on hot-smoked salmon by the interaction of heat and smoke or liquid smoke. *Journal of Food Protection*, 60, 649-654.
- Prabhu, A. S., Araújo, L. G., Silva, G. B., & Trindade, M.G. (2007). Virulence and rep-PCR analysis of *Pyricularia grisea* isolates from two Brazilian upland rice cultivars. *Fitopatologia Brasileira*, 32, 13-20.
- Prince, A. M., & Andrus, L. (1992). PCR: how to kill unwanted DNA. *BioTechniques*, 12, 358-360.

R

- Rademaker, J. L. W., & De Bruijn, F. J. (1997). Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. In: Gaetano-Anolles, G & Gresshoff, P. M. (Eds), *DNA markers: protocol, applications and overview*. J. Wiley and Sons, New York, pp 151-171.
- Rahmati, A., Gal, M., Northey, G., & Brazier, J. S. (2005). Subtyping of *Clostridium difficile* polymerase chain reaction (PCR) ribotype 001 by repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting. *The Journal of Hospital Infection*, 60, 56-60.
- Raj, H., & Liston, J. (1961). Survival of bacteria of public health significance in frozen sea foods. *Food Technology*, 15, 429-434.
- Ramos, M., & Lyon, W. J. (2000). Reduction of Endogenous bacteria associated with catfish fillets using the Grovac process. *Journal of Food Protection*, 63, 1231-1239.
- Randall, L. P., Ridley, A., Cooles, S. W., Sharma, M., Sayers, A. R., & Pumbwe, L. (2003). Prevalence of multiple antibiotic resistances in 443 *Campylobacter* spp. isolated from humans and animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 507-510.
- Randall, L. P., Cooles, S. W., Osborn, M. K., Piddock, L. J. V., Woodward, M. J. (2004). Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistances in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from human and animals in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, 208-216.

Ratkowsky, D. A., Olley, J., & Ross, T. (2005). Unifying temperature effects on the growth rate of bacteria and the stability of globular proteins. *Journal of Theoretical Biology*, 233, 351-362.

Ravelo, C., Magariños, B., Romalde, J. L., & Toranzo, A. E. (2001). Conventional versus miniaturized systems for the phenotypic characterization of *Lactococcus garvieae* strains. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 21, 136-144.

Regan, T. (1920). The classification of the fishes of the family Cichlidae. I. The Tanganyika Genera. *Annals and Magazine of Natural History*, 9, 33-53.

Règlement (CE) N° 2729/2000 de la Commission du 14 décembre 2000 portant modalités d'application relatives aux contrôles dans le secteur vitivinicole. *Journal officiel des Communautés Européennes*, 14 p.

Règlement (CE) N° 2065/2001 de la Commission du 22 Octobre 2001 établissant les modalités d'application du règlement (CE) n° 104/2000 du Conseil en ce qui concerne l'information du consommateur dans le secteur des produits de la pêche et de l'aquaculture. *Journal officiel des Communautés Européennes*, 3 p.

Règlement CE N° 178/2002 du Parlement Européen et du Conseil du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires. *Journal officiel des Communautés Européennes*, 24 p.

Règlement CE N° 852/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 avril 2004 relatif à l'hygiène des denrées alimentaires. *Journal officiel de l'Union Européenne*, 19 p.

Règlement CE N° 853/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale. *Journal officiel de l'Union Européenne*, 61 p.

Règlement CE N° 854/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant des produits d'origine animale destinés à la consommation humaine. *Journal officiel de l'Union Européenne*, 45 p.

Règlement CE N° 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. *Journal officiel de l'Union Européenne*, 26 p.

- Règlement CE N° 1664/2006 de la Commission du 6 novembre 2006 modifiant le règlement CE N° 2074/2005 en ce qui concerne les mesures d'application relatives à certains produits d'origine destinés à la consommation humaine et abrogeant certaines mesures d'application. *Journal officiel de l'Union Européenne*, 33 p.
- Renou, J. P., Deponge, C., Gachon, P., Bonnefoy, J. C., Coulon, J. B., Garel, J. P., Vérité, R., & Ritz, P. (2004). Characterisation of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry: cow milk. *Food Chemistry*, 85, 63-66.
- Reysenbach, A. L., Giver, L. J., Wickham, G. S., & Pace, N. R. (1992). Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3417-3418.
- Rhodes, M. W., & Kator, H. (1988). Survival of *Escherichia coli* et *Salmonella* spp. in estuarine environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2902-2907.
- Richard, C. (1982). Bactériologie et épidémiologie des espèces du genre *Klebsiella*. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 80, 127-145.
- RingØ, E. (1993a). Does chromic oxide (Cr₂O₃) affect faecal lipid and intestinal bacterial flora in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L)? *Aquaculture Fish Management*, 25, 341-344.
- RingØ, E. (1993b). The effect of chromic oxide (Cr₂O₃) on aerobic bacterial populations associated with the epithelial mucosa of Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.) *Canadian Journal of Microbiology*, 39, 1169-1173.
- RingØ, E., & Strøm, E. (1994). Microflora of Arctic char, *Salvelinus apinus* (L.); gastrointestinal microflora of free-living fish, and effect of diet and salinity on intestinal microflora. *Aquaculture Fish Management*, 25, 623-629.
- RingØ, E., & Gatesoupe, F. J. (1998). Lactic acid bacteria in fish: A review. *Aquaculture*, 160, 177-203.
- RingØ, E., & Birkbeck, T. H. (1999). Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquaculture Research*, 30, 73-93.
- Roberts, T. R., & Vidthayanon, C. (1991). Systematic revision of the Asian catfish family Pangasiidae with biological observations and descriptions of three new species. *Proceedings of the Natural Sciences of Philadelphia*, 143, 97-144.
- Robin, T., & Janda, J. M. (1996). *Pseudo-, Xantho-, Stenotrophomonas maltophila* : an emerging pathogen in search of a genus. *Clinical Microbiology Newsletter*, 18, 9-16.

- Rochelle, P. A., Cragg, B. A., Fry, J. C., Parkers, R. J., Weightman, A. J. (1994). Effect of sample handling on estimation of bacterial diversity in marine sediments by 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 15, 215-226.
- Röling, W. F. M., Kerler, J., Braster, M., Apriyantono, A., Stam, H., & Van Verseveld, H. W. (2001). Microorganisms with a taste for Vanilla : microbial ecology of traditional Indonesian vanilla curing. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1995-2003.
- Romero, J., & Navarrete, P. (2006). 16S rDNA analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microbial Ecology*, 51, 422-430.
- Romling, U., & Tummeler, B. (2000). Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 464-465.
- Rossmann, A., Haberhauer, G., Hölzl, S., Horn, P., Pichlmayer, F., & Voerkelius, S. (2000). The potential of multielement stable isotope analysis for regional origin assignment of butter. *European Food Research and Technology*, 211, 32-40.
- Ruano, G., & Kidd, K. K. (1992). Modeling of heteroduplex formation during PCR from mixtures of DNA templates. *PCR Methods and Applications*, 2, 112-116.
- Russell, N. J. (1997). Psychrophilic bacteria-molecular adaptations of membrane lipids. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118, 489-493.
- Ryser, E. T., Marth, E. H., & Taylor, S. L. (1984). Histamine production by psychrotrophic pseudomonads isolated from tuna fish. *Journal of Food Protection*, 47, 378-380.

S

- Sabanadesan, S., Lammerding, A.M., Griffiths, M.W. (2000). Survival of *Listeria innocua* in salmon following cold-smoke application. *Journal of Food Protection*, 63, 715-720.
- Sage, J. R., & Ingham, S. C. (1998). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 after freezing and thawing in ground beef patties. *Journal of Food Protection*, 61, 1181-1183.
- Sainclivier, M. (1983 a). L'Industrie alimentaire halieutique. Le poisson matière première. *Bulletin Scientifique et Technique de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique et du Centre de Recherche de Rennes*, 263 p.
- Sainclivier, M. (1983 b). L'Industrie alimentaire halieutique. Des techniques ancestrales à leur réalisation contemporaine : salage, séchage, fumage, marinage,

- hydrolysats. *Bulletin Scientifique et Technique de l'Ecole National Supérieure Agronomique et du Centre de Recherche de Rennes*, 366 p.
- Sainclivier, M. (1993). L'Industrie alimentaire halieutique. La conservation par des moyens physiques : l'utilisation du froid. *Bulletin Scientifique et Technique de l'Ecole National Supérieure Agronomique et du Centre de Recherche de Rennes*, 278 p.
- Sakamoto, T., Danzmann, R. G., Gharbi, K., Howard, P., Ozaki, A., Khoo, S. K., Woram, R. A., Okamoto, N., Ferguson, M. M., Holm, L. E., Guyomard, R., & Hoyheim, B. (2000). A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates. *Genetics*, 155, 1331–1345.
- Salam, K. I. (2008). Effect of marinating process on the microbiological quality of Pacific saury (*Cololabis saira*) during vacuum-packaged storage at 4°C. *International Journal of Food Science & Technology*, 43, 220-228.
- Sancristobal-Gaudy, M., Renand, G., Amigues, Y., Boscher, M.Y., Leveziel, H., & Bibe, B. (2000). Traçabilité individuelle des viandes bovines à l'aide de marqueurs génétiques. *INRA Productions Animales*, 13, 269-276.
- Sanders, J. W., Venema, G., & Kok, J. (1999). Environmental stress response in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 483-501.
- Sanni, A. I., Asiedu, M., & Ayernor, G. S. (2002). Microflora and chemical composition of Momoni, a Ghanaian fermented fish condiment. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 577-583.
- Sarter, S., Nguyen, H. N. K., Le, T. H., Lazard, J., Montet, D. (2007). Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. *Food Control*, 18, 1391-1396.
- Sasahara, K. C., & Zottola, E. A. (1993). Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. *Journal of Food Protection*, 56, 1022-1028.
- Schäfer, H., & Muyzer, G. (2001). Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology. *Methods in Microbiology*, 30, 425-452.
- Scharek, L., Guth, J., Reiter, K., Weyrauch, K. D., Taras, D., Schwerk, P., Schierack, P., Schmidt, M. F. G., Wieler, L. H. & Tedin, K. (2005). Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on the development of the immune system of sows and piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 105, 151-161.

- Schmidt, O., Quilter, J. M., Bahar, B., Moloney, A.P., Scrimgeour, C. M., Begley, I. S., & Monahan, F. J. (2005). Inferring the origin and dietary history of beef from C, N and S stable isotope ratio analysis. *Food Chemistry*, 91, 545-549.
- Sekiguchi, H., Watanabe, M., Nakahara, T., Xu, B., & Uchiyama, H. (2002). Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5142-5150.
- Shao, J. Z., Liu, J., Xiang, L. X. (2004). *Aeromonas hydrophila* induced apoptosis in *Carassius auratus* lymphocytes in vitro. *Aquaculture*, 229, 11-23.
- Sheffield, V. C., Cox, D. R., Lerman, L.S., & Myers, R. M. (1989). Attachment of a 40 bp G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragment by polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86, 232-236.
- Sheridan, J. J. (1982). Survival of *Salmonella Kentucky* in frozen minced pork, beef and lamb. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 6, 177-181.
- Shewan, J. M (1977). The bacteriological of fresh and spoilage fish and the biochemical changes induced by bacterial action. In: Proceeding of the Conference on Handling, Processing and Marketing of tropical fish, Tropical Products Institute, London, pp 51-66.
- Shiose, J., Wakabayashi, H., Tominaga, M., & Egusa, S. (1974). A report on a disease of cultured carp due to a capsulated *Pseudomonas*. *Fish Pathology*, 9, 79-83.
- Shuhaimi, M., Ali, A.M., Saleh, N.M., & Yazid, A.M. (2001). Utilisation of enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequence-based PCR to fingerprint the genomes of *Bifidobacterium* isolates and other probiotic bacteria. *Biotechnology Letters*, 23, 731-736.
- Siddiqui, K. S., Bokhari, S. A., Afzal, A., & Singh, S. (2004). A novel thermodynamic relationship based on Kramers theory for studying enzyme kinetics under high viscosity. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 56, 403-407.
- Silvestri, G., Santarelli, S., Aquilanti, L., Beccaceci, A., Osimani, A., Tonucci, F., & Clementi, F. (2007). Investigation of the microbiol ecology of Ciauscolo, a traditional Italian salami, by culture-dependent techniques and PCR-DGGE. *Meat Science*, 77, 413-423.

- Simpkins, W. A., Louie, H., Wu, M., Harrison, M., Goldberg, D. (2000). Trace elements in Australian orange juice and other products. *Food Chemistry*, 71, 423-433.
- Singh, B.R., & Kulshreshtha, S.B. (1992). Preliminary examinations on the enterotoxigenicity of isolates of *Klebsiella pneumoniae* from seafood. *International Journal of Food Microbiology*, 16, 349-352.
- Skaldal, P., Mascini, M., Sal Vadori, C., & Zannoni, G. (1993). Detection of bacterial contamination in sterile UHT milk using an L-Lactate biosensor. *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 508-512.
- Smith, B. N., & Epstein, S. (1970). Biogeochemistry of the stable isotopes of hydrogen and carbon in salt marsh biota. *Plant Physiology*, 46, 738-742.
- Smith, C. L. (1990). Moronidae. In : Quero, J.C., Hureau, J.C., Karrer, C., Post, A., Saldanha, L (Eds.) *Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA)*. JNICT, Lisbon, SEI, Paris; and UNESCO, Paris. Vol. 2, pp 692-694.
- Smith, C. T., Templin, W. D., Seeb, J.E., & Seeb, L. W. (2003). Nuclear and mitochondrial SNPs provide high-throughput resolution for migratory studies of Chinook salmon.
http://www.genetics.cf.adfg.state.ak.us/publish/posters/Yukon_Chinook_SNPs.pdf.
- Spanggaard, B., Joergensen, F., Gram, L., Huss, H. H. (1993). Antibiotic resistance against oxytetracycline and oxolinic acid of bacteria isolated from three freshwater fish farms and an unpolluted stream in Denmark. *Aquaculture*, 115, 195-207.
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, T.J., Nielsen, T., Appel, K., & Gram, L. (2000). The microbiota of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification. *Aquaculture*, 182, 1-15.
- Speck, M. L. & Ray, B. (1977). Effect of freezing and storage on micro-organisms in frozen foods: A review. *Journal of Food Protection*, 40, 333-336.
- Stackebrandt, E., & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 846-849.
- Staley, J., & Konopka, A. (1985). Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganism in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology*, 39, 321-346.
- Stanley, P. M. (1983). Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Canadian Journal of Microbiology*, 29, 1493-1499.

- Stead, D., & Park, S. F. (2000). Roles of Fe superoxide dismutase and catalase in resistance of *Campylobacter coli* to freeze-thaw stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3110-3112.
- Strom, E., & RingØ, E. (1993). Changes in the bacterial composition of early developing cod, *Gadus morhua* (L.) larvae following inoculation of *Lactobacillus plantarum* into the water. In: Walther, B., & Fyhn, H.J. (Eds). *Physiological and biochemical aspects of fish larval development*. Bergen: University of Bergen, Norway, pp 226-228.
- Sugita, H., Tokuyama, K., & Deguchi, Y. (1985). The intestinal microflora of carp, *Cyprinus carpio*, grass carp, *Ctenopharyngodon idella* and tilapia, *Sarotherodon niloticus*. *Bulletin Japan Society Science Fisheries*, 51, 1325-1329.
- Sugita, H., Shibuya, K., Shimooka, H., & Deguchi, Y. (1996). Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. *Aquaculture*, 145, 195-203.
- Supriyadi, S. K., Suzuki, M., Yoshida, K., Muto, T., Fujita, A., Tomita, N., & Watanabe, N. (2004). Maturity discrimination of snake fruit (*Salacca edulis* Reinw) cv. *Pondoh* based on volatiles analysis using an electronic nose device equipped with a sensor array and fingerprint mass spectrometry. *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 44-50.
- Suzuki, M. T., & Giovannoni, S. J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 625-630.
- Syvökienė, J., & Mickėnienė, L. (1998). Microorganisms of the digestive tract of hydrobiotonts as indicators of pollution. *ICES Symposium on Brackish Water Ecosystems*, Helsinki, 25-28 August 1998.
- Syrmis, M. W., O'Carroll, M. R., Sloots, T. P., Coulter, C., Wainwright, C. E., Bell, S. C., Nissen, M. D. (2004). Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. *Journal of Medical Microbiology*, 53, 1089-1096.

T

- Tanner, M., Goebel, B. M., Dojka, M. A., & Pace, N. R. (1998). Specific ribosomal sequences from diverse environmental settings correlate with experimental contaminants. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3110-3113.
- Tarnawski, S., Hamelin, J., Locatelli, L., Aragno, M., & Fromin, N. (2003). Examination of Gould's modified S1 (mS1) selective medium and Angle's non-

- selective medium for describing the diversity of *Pseudomonas* spp. in soil and root environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 45, 97-104.
- Taylor, J. H., Rogers, S. J., & Hoyal, J. T. (1999). A comparison of the bactericidal efficacy of 18 disinfectants used in the food industry against *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas aeruginosa* at 10 and 20°C. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 718-725.
- Taylor, S. L. & Speckard, M. (1983). Isolation of histamine-producing bacteria from frozen tuna. *Marine and Fishery Review*, 45, 35-39.
- Taylor, S. L., & Sumner, S. S. (1987). Determination of histamine, putrescine and cadaverine. In: Kramer, D. E., & Liston, J. (Eds). *Seafood quality determination*. Elsevier, New York, pp 235-245.
- Thys Van Den Audenaerde, D. F. E. (1971). Some new data concerning the *Tilapia* species of the subgenus *Sarotherodon* (Pisces: Cichlidae). *Revue Zoologique Botanique Africaine*, 84, 203-216.
- Temmerman, R., Scheirlinck, I., Huys, G., & Swings, J. (2003). Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 220-226.
- Teuber, M. (2001). Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 4, 493-499.
- Toranzo, A. E., Magarinos, B., & Romalde, J. L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246, 37-61.
- Towner, K. J. (1997). Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. *Journal of Medical Microbiology*, 46, 721-746.
- Trakulchang, S. P., & Kraft, A. A. (1977). Survival of *Clostridium perfringens* in refrigerated and frozen meat and poultry items. *Journal of Food Science*, 42, 518-521.
- Tran Van, V., Berge, O., Balandreau, J., Ngo Ke, S., & Heulin, T. (1996). Isolement et activité nitrogénasique de *Burkholderia vietnamiensis*, bactérie fixatrice d'azote associée au riz (*Oryza sativa* L) cultivé sur un sol sulfaté du Viêt-nam. *Agronomie*, 16, 479-491.
- Trewavas, E. (1982). Generic grouping of Tilapiini used in aquaculture. *Aquaculture*, 27, 79-81.

- Tripathy, S., Kumar, N., Mohanty, S., Samanta, M., Mandal, R. N., & Maiti, N. K. (2007). Characterisation of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from freshwater culture systems. *Microbiological Research*, 162, 391-396.
- Trust, T. J., & Sparrow, R. A. H. (1974). The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonids fishes. *Canadian Journal of Microbiology*, 20, 1219-1228.
- Tsai, G. J., Chen, T. H. (1996). Incidence and toxigenicity of *Aeromonas hydrophila* in seafood. *International Journal of Food Microbiology*, 38, 111-116.
- Tsai, Y. H., Lin, C. Y., Chang, S. C., Chen, H. C., Kung, H. F., Wei, C. I., & Hwang, D. F. (2005). Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in salted mackerel in Taiwan. *Food Microbiology*, 22, 461-467.
- Tuncan, E. U. (1993). Effect of cold temperature on germicidal efficacy of quaternary ammonium compound, iodophor and chlorine on *Listeria*. *Journal of Food Protection*, 56, 1029-1033.

V

- Vallaey, T., Topp, E., Muyzer, G., Macheret, V., Laguerre, G., & Soulas, G. (1997). Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiology Ecology*, 24, 279-285.
- Van Beek, S., & Priest, F. G. (2002). Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisky fermentation: a polyphasic study. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 297-305.
- Van Belkum, A., Quint, W. G. V., De Pauw, B. E., Melchers, W. J. G., & Meis, J. F. (1993). Typing of *Aspergillus* species and *Aspergillus fumigatus* isolates by interrepeat polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 2502-2505.
- Van den Bogaard, A. E., & Stobberingh, E. E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14, 327-335.
- Van der Gucht, K., Vandekerckhove, T., Vloemans, N., Cousin, S., Muylaert, K., Sabbe, K., Gillis, M., Declerk, S., De Meester, L., & Vyverman, W. (2005). Characterization of bacterial communities in four freshwater lakes differing in nutrient load and food web structure. *FEMS Microbiology Ecology*, 53, 205-220.

- Vanhaecke, E., Remon, J.P., Moors, M., Raes, F., De Rudder, D., & Van Peteghem, A. (1990). Kinetic of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel: Role of cell surface hydrophobicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 788-795.
- Van Hannen, E. J., Zwart, G., Van Agterveld, M. P., Gons, H. J., Ebert, J., & Lannbroek, H. J. (1999). Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with virus. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 795-801.
- Varma, P. R. G., Iyer, T. S. G., Joseph, M. A., & Shaji, Z. (1989). Studies on the incidence of *Vibrio cholerae* in fishery products. *Journal of Food Science and Technology*, 26, 341-342.
- Vatanyoopaisarn, S., Nazli, A., Dodd, C. E. R., Rees, C. E. D., & Waites, W. M. (2000). Effet of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 860-863.
- Vendrell, D., Balcázar, J. L., Ruiz-Zarzuela, I., De Blas, I., Gironés, O., & Múzquiz, J. L. (2006). *Lactococcus garvieae* in fish : A review. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 29, 177-198.
- Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19, 6823-6831.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F.J., & Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5, 25-40.
- Vivekanandhan, G., Hatha, A. A. M., Lakshmanaperumalsamy, P. (2005). Prevalance of *Aeromonas hydrophila* in fish and prawns from the seafood market of Coimbatore, South India. *Food Microbiology*, 22, 133-137.
- Vernez, I., Hauser, P., Bernasconi, M. V., & Blanc, D. S. (2005). Population genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* using multilocus sequence typing. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 43, 29-35.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., & Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria with repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5, 25-40.

Von Wintzingerode, F., Göbel, U.B., & Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: Pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 21, 213-229.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Vandelee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peelman, J., Kuiper, M., & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407-4414.

Vietnam Fisheries Information Center (FICen) (2008). Ministry of Fishery, Vietnam.
<http://www.fistenet.gov.vn>

W

Wakabayashi, H., Egusa, S. (1972). Characteristics of a *Pseudomonas* sp. from an epizootic of pond-cultured eels (*Anguilla japonica*). *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 38, 577-587.

Wakabayashi, H., Sawada, K., Ninomiya, K., Nishimori, E. (1996). Bacterial hemorrhagic ascites of ayu caused by *Pseudomonas* sp. *Fish Pathology*, 31, 239-240.

Wang, C., & Silva, J. L. (1999). Prevalence and characterization of *Aeromonas* species isolated from processed channel catfish. *Journal of Food Protection*, 62, 30-34.

Wang, Y., Kong, L. K., Li, C., & Bureau, D. P. (2006). Effect of replacing fish meal with soybean meal on growth, feed utilization and carcass composition of cuneate drum (*Nibea miichthioides*). *Aquaculture*, 261, 1307-1313.

Wang, Y. B., Tian, Z. Q., Yao, J. T., & Li, W. F. (2008). Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture*, 277, 203-207.

Ward, D. M., Weller, R., & Bateson, M. M. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, 345, 63-65.

Ward, D. M., Ferris, M. J., Nold, S. C., & Bateson, M. M. (1998). A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 1353-1370.

Wasi, S., Jeelani, G., & Ahmad, M. (2007). Biochemical characterization of a multiple heavy metal, pesticides and phenol resistant *Pseudomonas fluorescens* strain. *Chemosphere*, 71, 1348-1355.

- Wassenaar, L. I., Hobson, K. A. (2001). A stable-isotope approach to delineate geographical catchment areas of avian migration monitoring stations in North America. *Environmental Science & Technology*, 35, 1845–1850.
- Welcome, R. L. (1988). International introduction of inland aquatic species. *FAO Fisheries Technical Paper 294*, 318 p.
- Westerdahl, A., Christer Olsson, J., Kjelleberg, S., & Conway, P. L. (1991). Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) – associated bacteria with inhibitory effect against *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2223-2228.
- Whitaker, J. M., Cristol, D. A., & Forsyth, M. H. (2004). Prevalence and genetic diversity of *Bacillus licheniformis* in avian plumage. *Journal of Field Ornithology*, 76, 264-270.
- Whyte, P., McGill, K., & Collins, J. D. (2003). An assessment of steam pasteurization and hot water immersion treatments for the microbiological decontamination of broiler carcasses. *Food Microbiology*, 20, 111-117.
- Widjoatmodjo, M. N., Fluit, A.C., & Verhoef, J. (1995). Molecular identification of bacteria by fluorescence-based PCR single strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 2601-2606.
- Widders, P. R., Coates, K. J., Warners, S., Beattie, J. C., Morgan, I. R., & Hickey, M. W. (1995). Controlling microbial contamination of beef and lamb meat during processing. *Australian Veterinary Journal*, 72, 208-211.
- Wikström, P., Anderson, A. C., Forsman, M. (1999). Biomonitoring complex microbial communities using random amplified polymorphic DANN and principal component analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 28, 131-139.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.
- Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3741-3751.
- Wirtanen, G., Salo, S., Helander, I.M., & Mattila-Sandholm, T. (2001). Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 20, 37-50.

- Wolffs, P., Norling, B., & Radström, P. (2005). Risk assessment of false-positive quantitative real-time PCR results in food, due to detection of DNA originating from dead cells. *Journal of Microbiological Methods*, 60, 315-323.
- Wong, H.-C., Chen, M.-C., Liu, S.-H., & Liu, D.-P. (1999). Incidence of highly genetically diversified *Vibrio parahaemolyticus* in seafood imported from Asian country. *International Journal of Food Microbiology*, 52, 181-188.
- Wood, C. R., Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, J. R. (1993). Whole-cell repetitive element sequence-based polymerase chain reaction allows rapid assessment of clonal relationships of bacteria isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 1927-1931.
- Woese, C. R., & Fox, G. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 74, 5088-5090.
- Wouters, J. A., Rombouts, F. M., & De Vos, W. M. (1999). Cold shock proteins and low-temperature response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4436-4442.
- Wu, F., & Della-Latta, P. (2002). Molecular typing strategies. *Seminars in Perinatology*, 26, 357-366.

X

- Xu, J., Moore, J. E., Murphy, P. G., Millar, B. C., & Elborn, J. S. (2004). Early detection of *Pseudomonas aeruginosa* comparison of conventional versus molecular (PCR) detection directly from adult patients with cystic fibrosis (CF). *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 20, 3-21.

Y

- Yabuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., & Arakawa, M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology and Immunology*, 36, 1251-1275.
- Yuntseover, Y., & Gat, J. R. (1981). Atmospheric waters. *IAEA technical reports-stable isotope hydrology*, 21, 103-142.

Z

- Ziha-Zarifi, I., Llanes, C., Köhler, T., Pechere, J. C., & Plesiat, P. (1999). In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*

overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 287-291.

Zoetendal, E.G., Akkermans, A.D., & De Vos, W. M. (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3854-3859.

Zuckerland, E., & Pauling, L. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Bryson, V., & Vogel, H. J. (Eds). *Evolving Genes and Proteins*. Academic Press, New York, pp 97-166.

ANNEXE 1

Préparation des réactifs pour l'extraction d'ADN*Tampon Tris-EDTA (TE) à pH 8.0*

Le tampon Tris-HCl permet de maintenir le pH nécessaire à l'activité des enzymes de lyse cellulaire et l'EDTA est un chélateur des ions nécessaire à l'activité des DNases bactériennes. Il est composé des solutions suivantes : 10 mM Tris-HCl pH 8,0 (Promega, France) et 1,0 mM EDTA pH 8,0 (Promega, France). Ce tampon est stérilisé à 121°C pendant 15 min.

Tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE) 50 X à pH 8,3 (Eppendorf, Allemagne)

Il est composé des solutions suivantes : 2M Tris-Acétate pH 8,3 et 0,05 M EDTA pH 8,3. Le tampon est dilué avec de l'eau distillée 50 fois avant usage.

Solution de lysozyme 25 mg/mL

25 mg de Lysozyme (Eurobio, France) sont solubilisés dans 1 mL d'eau pure (Eppendorf, Allemagne).

Solution de protéinase K 20 mg/mL

20 mg de Protéinase K (Eurobio, France) sont solubilisés dans 1 mL d'eau pure (Eppendorf, France).

Solution de SDS (Dodecyl sulfate de sodium) 20%

20 g de Dodecyl sulfate de sodium (Fluka, Allemagne) sont solubilisés dans 100 mL d'eau stérile (qsp).

Solution de NaCl 3M

175,32 g (3M) de NaCl (Panreac, Espagne) sont solubilisés dans 1 L d'eau distillée (qsp). La solution finale est autoclavée à 121°C, 15 min.

Solution de MATAB (Mixed Alkyl Trimethyl Ammonium Bromide) 2%

2 g de MATAB (Fluka, Allemagne) solubilisés dans 100 mL d'une solution de NaCl 3M.

Mélange de Phénol/ Chloroforme/ Alcool isoamylique

Ce mélange d'extraction des ADN est préparé selon les proportions volumiques suivantes : Phénol (Fluka, Allemagne) 25mL/Chloroforme (Carlo Erba, France) 24mL/Alcool isoamylique (Panreac, Espagne) 1mL.

Mélange Chloroforme/ Alcool isoamylique

Ce mélange d'extraction des ADN est préparé selon les proportions volumiques suivantes : Chloroforme (Carlo Erba, France) 24 mL/Alcool isoamylique (Panreac, Espagne) 1 mL.

Solution d'acétate de sodium 3M, pH 5,2

246,09 g (3M) de CH₃COONa (Panreac, Espagne) sont solubilisés dans 1L d'eau distillée ajustée à pH 5,2 par de l'acide acétique. La solution est autoclavée à 121°C, 15 min.

Eau peptonnée tamponnée (bioMérieux, France)

Bouillon utilisé pour récupérer des bactéries totales de poisson afin de réaliser une extraction d'ADN.

Préparation : Verser 25,5 g de milieu déshydraté dans 1 L d'eau distillée et porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser 20 min à 121°C à l'autoclave.

Composants	g/L
Peptone de caséine et de gélatine	10,0
Chlorure de sodium	5
Di-sodium hydrogénophosphate	9
Potassium di-hydrogénophosphate	1,5
pH 7,0	

ANNEXE 2

Milieux de culture*Gélose nutritive* (Oxoid, UK)

La gélose nutritive sert de milieu de culture de base pour repiquer les souches à conserver, ou pour vérifier la pureté des subcultures avant d'effectuer des tests biochimiques et sérologiques.

Préparation : Verser 28g de milieu déshydraté dans un litre d'eau distillée et porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser 15 min à 121°C à l'autoclave.

Composants	g/L
Extrait de viande de bœuf	1,0
Extrait de levure	2,0
Peptone	5,0
Chlorure de sodium	5,0
Agar	15,0
pH 7,4 ± 0,2	

Gélose d'isolement des Pseudomonas (Difco™)

Ce milieu permet la sélection des espèces de *Pseudomonas*. L'Irgasan, un agent antimicrobien, inhibe sélectivement les bactéries à gram positif et à gram négatif autres que les espèces de *Pseudomonas* spp.

Préparation : Verser 45 g de milieu déshydraté dans un litre d'eau distillée, ajouter 20 mL de glycérol et porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser 15 min à 121°C à l'autoclave.

Composants	g/L
Peptone	20,0
Chlorure de magnésium	1,4
Sulfate de potassium	10,0
Irgasan	0,025
Agar	13,6
pH 7,0 ± 0,2	

Bouillon nutritif (Bio-Rad)

Ce bouillon favorise de la croissance des bactéries.

Préparation : Verser 13 g de milieu déshydraté dans 1 L d'eau distillée et porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser 15 min à 121°C à l'autoclave.

Composants	g/L
Peptone	10,0
Extrait de viande	5,0
Chlorure de sodium	5,0
pH 7,0 ± 0,2	

ANNEXE 3

Protocole pour la purification de l'ADN

a. *A partir d'un gel de DGGE*

1. Exciser la bande d'ADN à partir du gel de DGGE et transférer dans un microtube Eppendorf.
2. Ajouter 100µL du tampon TE au fragment du gel. Incuber pendant la nuit à 37°C (élution passive). Transférer 100µL de la phase aqueuse dans un nouveau microtube Eppendorf.

b. *A partir d'un gel d'agarose TM*

1. Exciser la bande d'ADN en utilisant un scalpel stérile et transférer un morceau de 300 mg d'agarose dans un microtube de 1,5 mL.
2. Incuber à 70°C dans un bain marie jusqu'à ce que l'agarose fonde

A partir de cette étape, les mêmes étapes sont suivies pour les 2 produits :

3. Ajouter 1mL de résine. Vortexer pendant 20 sec pour bien mélanger.
4. Pour chaque échantillon, préparer une mini colonne Wizard. Enlever et séparer le piston à part de la seringue. Relier la seringue à la partie Luer-Lok de chaque mini colonne.
5. Pipeter le mélange résine/ADN dans la seringue. Insérer le piston lentement, et pousser doucement le produit à travers la colonne.
6. Détacher la seringue de la mini colonne et enlever le piston de la seringue. Rattacher la seringue à la mini colonne. Pipeter 2 mL d'isopropanol 80% dans la seringue.
7. Insérer le piston et pousser doucement à travers la colonne.
8. Enlever la seringue et transférer la colonne sur un microtube de 1,5 mL. Centrifuger la colonne à 10.000 g pendant 2 min.
9. Transférer la colonne sur un microtube Eppendorf neuf.
10. Ajouter 40 µL d'eau stérile et attendre 15 min. Centrifuger le microtube à 10 000 g pendant 20 sec.
11. Repasser les 40 µL dans la colonne. Attendre 1 min et centrifuger à 10 000 g pendant 20 sec.
12. Jeter la colonne et conserver l'ADN à -20°C.

ANNEXE 4

Publication liées à la thèse

Le Nguyen, D. D., Ha, N. H., Dijoux, D., Loiseau, G., & Montet, D. (2008). Determination of fish origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE : An application on *Pangasius* fish from Vietnam. *Food Control*, 19, 454-460.

Le Nguyen, D. D., Gemrot, E., Loiseau, G., & Montet, D. (2008). Determination of citrus fruit origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE : an application to clementine from Morocco and Spain. *Fruit*, 63, 75-84.

Titre : Détermination de l'origine géographique des poissons par obtention de l'empreinte génétique de leur communauté bactérienne par PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

RÉSUMÉ

La détermination de l'origine géographique est une des exigences de la traçabilité des produits alimentaires. Notre hypothèse était que l'environnement de l'aliment pouvait avoir une influence sur la diversité des flores bactériennes commensales des poissons. L'origine géographique des poissons a donc été approchée par la caractérisation de la flore microbienne spécifique de la ferme de production ou du lieu de transformation et de stockage. Une technique de biologie moléculaire couplée à une analyse d'images et à des méthodes statistiques a été développée afin de relier les profils bactériens obtenus par PCR-DGGE à l'origine géographique des fermes aquacoles. Dans la première partie, nous avons différencié par DGGE des poissons d'espèces différentes qui venaient de sites différents: les bars de France, les poissons-chats *Pangasius* du Vietnam et du Cambodge. Les profils DGGE microbiens des poissons et de l'eau d'un même étang sont étroitement similaires, confirmant notre hypothèse de départ. Le séquençage des bandes issues de la DGGE a permis d'identifier les souches bactériennes dominantes des poissons-chats au Vietnam. Dans la deuxième partie, nous avons confirmé la pérennité des profils microbiens au cours de la saison des pluies et de la saison sèche au Vietnam. Les poissons pêchés en mer ont un profil bactérien variable alors que la même espèce élevée en aquarium obtient un profil similaire pour tous les poissons. Les traitements de transformation tels que le séchage et le marinage ont une forte influence sur la communauté bactérienne des poissons. La congélation ou la réfrigération ne modifient pas fortement les profils DGGE. La persistance des marqueurs bactériens au cours des traitements technologiques a été vérifiée au niveau industriel dans une usine de transformation en filets des poissons-chats *Pangasius* qui sont les principaux produits exportés du Vietnam. L'écologie bactérienne des poissons a été suivie par PCR-DGGE à chaque étape de leur transformation montrant que le profil bactérien entre le produit initial et le produit fini est différent mais conserve suffisamment d'information pour discriminer l'origine. Dans la dernière partie, nous avons eu recours à la Rep-PCR pour étudier la diversité des souches de *Pseudomonas* qui ont montré une persistance aux procédures de transformation. Les *Pseudomonas* restent présents sur des filets finis ainsi que sur la surface des équipements après le nettoyage et la désinfection. 27 souches de *Pseudomonas* ont été classées dans 7 grandes groupes par rep-PCR et identifiées par séquençage.

Discipline : Biotechnologie, Microbiologie

Mots clés : PCR-DGGE, origine géographique, poisson-chat *Pangasius*, bars, *Pseudomonas*, traçabilité.

Titre en anglais: Determination of geographical origin of fish by DNA fingerprinting of their bacterial community by PCR-DGGE technique (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

ABSTRACT

The determination of geographical origin is one of the inquiries of the food traceability system. Our hypothesis is that the environment could have an influence on the diversity of the bacterial communities of fish. The geographical origin of fish can be determined by the characterisation of the specific bacterial flora of the aquaculture farm or of the production and storage sites. A biological molecular technique PCR-DGGE, coupled to image analysis and statistic methods, have been developed in order to link the bacterial profiles with the geographical origin of the aquaculture farms. In the first chapter, we have distinguished by DDGE the different fish species from different sites: sea bass from France, *Pangasius* catfish from Vietnam and from Cambodia. The DGGE profiles of the fish bacteria and the water in the same pond were narrowly similar, confirming our hypothesis. The sequencing of the bands excised from DGGE gel permitted to identify the dominant bacterial species in the catfish from Vietnam. In the second chapter, we confirmed the perennality of the microbial profiles during the rainy and the dry season in Vietnam. The fish captured in the sea had variable bacterial profiles, while the same fish raised in aquarium had a similar profile for all of them. Drying and pickling had a strong effect on the fish bacterial communities. Freezing or chilling did not change strongly the DGGE profiles. The persistence of the bacterial markers during the technical treatment has been verified at industrial scale in a factory processing *Pangasius* fillets, which is the principal exported product of Vietnam. The microbial ecology of the fish has been followed by PCR-DGGE for each processing step showing that the bacterial profiles of the initial product and the final product were different but preserved enough information to discriminate the origin. In the last chapter, Rep-PCR was used to study the diversity of *Pseudomonas* strains which showed persistence to the processing procedure. The *Pseudomonas* strains remained on the final fillets as well as on the equipment surfaces after cleaning and disinfection. 27 *Pseudomonas* strains classified in 7 big groups have been identified by sequencing.

Discipline: Biotechnology, Microbiology

Key words: PCR-DGGE, geographical origin, catfish *Pangasius*, sea bass, *Pseudomonas*, traceability.

Intitulé et adresse du laboratoire

CIRAD, UMR 95, Qualisud

Equipe sûreté des aliments

TA B-95/16

73, rue Jean-François Breton

34398 Montpellier Cedex 5